

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/49153
C12N 15/54, 9/10, 15/11, 9/00, 5/10, C12P 21/00, C12Q 1/68			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. August 2000 (24.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT00/00040		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)		(30) Prioritätsdaten: A 270/99 18. Februar 1999 (18.02.99) AT	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: ALTMANN, Friedrich [AT/AT]; Institut für Chemie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, A-1190 Wien (AT).		(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).	
<p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			
<p>(54) Title: FUCOSYL TRANSFERASE GENE</p> <p>(54) Bezeichnung: FUCOSYLYLTRANSFERASE-GEN</p> <p>(57) Abstract The invention relates to a DNA molecule which comprises a sequence according to SEQ ID No: 1 with an open reading frame of base pair 211 to base pair 1740 or which exhibits at least 50 % homology to the above-mentioned sequence, or which is hybridized with the above-mentioned sequence under stringent conditions, or which comprises a sequence that is degenerated to the above-mentioned DNA sequence due to the genetic code. The sequence codes for a vegetable protein comprising a fucosyl transferase activity or is complementary thereto.</p> <p>(57) Zusammenfassung Es wird ein DNA-Moleköl zur Verfügung gestellt, das eine Sequenz gemäß der SEQ ID No: 1 mit einem offenen Leserahmen von Basenpaar 211 bis Basenpaar 1740 umfasst oder zumindest 50 % Homologie zur obengenannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder eine Sequenz umfasst, die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist, wobei die Sequenz für ein pflanzliches Protein mit einer Fucosyltransferase-Aktivität codiert oder dazu komplementär ist.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Leitland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KI	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

- 1 -

Fucosyltransferase-Gen

Die Erfindung betrifft Polynukleotide, die für eine Fucosyltransferase codieren. Weiters betrifft die Erfindung Teilsequenzen dieser Polynukleotide sowie Vektoren mit diesen Polynukleotiden, rekombinante Wirtszellen, Pflanzen und Insekten, die mit den Polynukleotiden bzw. davon abstammender DNA transfektiert sind sowie die in diesen Systemen produzierten Glykoproteine.

Glykoproteine weisen eine Vielfalt und Komplexität von Kohlenhydrat-Einheiten auf, wobei die Zusammensetzung und Anordnung der Kohlenhydrate für unterschiedliche Organismen charakteristisch ist. Die Oligosaccharid-Einheiten der Glykoproteine haben eine Reihe von Aufgaben, so sind sie z.B. wichtig in der Stoffwechselregulation, sie sind an der Vermittlung von Zell-Zell-Wechselwirkungen beteiligt, sie bestimmen die Zirkulationszeiten von Proteinen im Blutkreislauf und sie sind ausschlaggebend für die Erkennung von Epitopen in Antigen-Antikörper-Reaktionen.

Die Glykosylierung von Glykoproteinen beginnt im endoplasmatischen Retikulum (ER), wo die Oligosaccharide entweder durch N-glykosidische Bindungen an Asparagin-Seitenketten oder durch O-glykosidische Bindungen an Serin- oder Threonin-Seitenketten gebunden werden. Die N-gebundenen Oligosaccharide enthalten ein gemeinsames Core aus einer Pentasaccharid-Einheit, die aus drei Mannose- und zwei N-Acetylglucosaminresten besteht. Zur weiteren Modifikation der Kohlenhydrat-Einheiten werden die Proteine vom ER zum Golgi-Komplex transportiert. Die Struktur der N-gebundenen Oligosaccharideinheiten von Glykoproteinen wird von ihrer Konformation und der Zusammensetzung der Glycosyltransferasen der Golgi-Kompartimente bestimmt, in denen sie prozessiert werden.

Es wurde gezeigt, dass im Golgi-Komplex einiger Pflanzen- und Insektenzellen die Core-Pentasaccharideinheit durch Xylose und α 1,3-gebundene Fucose substituiert wird (P. Lerouge et al. 1998 Plant Mol. Biol. 38, 31-48; Rayon et al. 1998 L. Exp. Bot. 49, 1463-1472). Das entstehende Heptasaccharid "MMXF³" stellt den Hauptoligosaccharid Typ in Pflanzen dar (Kurosaka et al. 1991 J.Biol.Chem., 266, 4168-4172). So weisen z.B. die Meerrettich Peroxidase, Karotten β -Fructosidase und Erythrina

- 2 -

cristagalli Lectin als auch die Honigbienengift Phospholipase A2 oder die neuronalen Membran Glykoproteine aus Insekten Embryonen α 1,3-Fucosereste, die an das Glykancore gebunden sind, auf. Diese Strukturen werden auch komplexe N-Glykane bzw. Mannose defiziente oder trunkierte N-Glykane genannt. Die α -Mannosylreste können weiters durch GlcNAc ersetzt werden, an die Galaktose und Fucose gebunden sind, so dass eine Struktur hergestellt wird, die dem humanen Lewis a Epitop entspricht (Melo et al. 1997, FEBS Lett. 415, 186-191; Fitchette-Laine et al. 1997 Plant J. 12, 1411-1417).

Weder die Xylose noch die α 1,3-gebundene Fucose kommen in Säugerglykoproteinen vor. Es stellte sich heraus, dass die Core- α 1,3-Fucose eine wichtige Rolle in der Epitoperkennung von Antikörpern spielt, die gegen pflanzliche und Insekten-N-gebundene Oligosaccharide gerichtet sind (I.B.H. Wilson et al., Glycobiology Vol. 8, Nr. 7, S. 651-661, 1998) und dadurch Immunreaktionen im menschlichen oder tierischen Körper gegen diese Oligosaccharide auslösen. Der α 1,3-Fucoserest scheint weiters eine der Hauptursachen für die weit verbreitete allergische Kreuzreakтивität zwischen verschiedenen pflanzlichen und Insekten-Allergenen zu sein (Tretter et al., Int. Arch. Allergy Immunol. 1993; 102:259-266) und wird auch "kreuzreaktive Kohlenhydrat Determinante" (CCD) genannt. Bei einer Studie von Epitopen von Tomaten und Graspollen wurden ebenfalls α 1,3-gebundene Fucoseresten als gemeinsame Determinante festgestellt, was der Grund für das häufige gemeinsame Auftreten von Tomaten- und Graspollenallergien in Patienten zu sein scheint (Petersen et al. 1996, J. Allergy Clin. Immunol., Vol 98, 4; 805-814). Die CCDs verschleiern weiters durch das häufige Auftreten von immunologischen Kreuzreaktionen Allergie-Diagnosen.

Diese immunologischen Reaktionen, die von pflanzlichen Proteinen im menschlichen Körper ausgelöst werden, sind das Hauptproblem bei der medizinischen Verwendung von in Pflanzen produzierten, rekombinanten menschlichen Proteinen. Um dieses Problem zu umgehen, müsste die α 1,3 Core-Fucosylierung verhindert werden. Es konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Oligosaccharide, die anstelle einer L-Fucose (6-Deoxy-L-Galaktose) eine L-Galaktose aufweisen, dennoch voll biologisch aktiv sind (E. Zablockis et al. 1996, Science, Vol 272). Gemäß einer ande-

ren Studie wurde eine Mutante der Pflanze *Arabidopsis thaliana* isoliert, dem die N-Acetyl-Glucosaminyl-Transferase I fehlt, das erste Enzym in der Biosynthese von komplexen Glykanen. Die Biosynthese der komplexen Glykoproteine in dieser Mutante ist damit gestört. Dennoch sind diese mutierten Pflanzen in der Lage, sich unter bestimmten Bedingungen normal zu entwickeln (A. Schaewen et al. 1993, Plant Physiol. 102; 1109-1118).

Um die Bindung der Core- α 1,3 Fucose in einem Oligosaccharid gezielt zu unterbinden, ohne auch in andere Glykosylierungsschritte einzugreifen, müsste nur das Enzym ausgeschalten werden, das direkt für diese spezifische Glykosylierung verantwortlich ist, nämlich die Core- α 1,3-Fucosyltransferase. Sie wurde erstmals aus Mungo Bohnen isoliert und charakterisiert, wobei festgestellt wurde, dass die Aktivität dieses Enzyms abhängig von der Gegenwart von nichtreduzierenden GlcNAc-Enden ist (Staudacher et al., 1995, Glycoconjugate J. 12, 780-786). Diese Transferase, die nur in Pflanzen und Insekten, nicht aber im Menschen oder anderen Wirbeltieren vorkommt, müsste gezielt inaktiviert oder unterdrückt werden, so dass menschliche Proteine, die in Pflanzen oder pflanzlichen Zellen bzw. auch Insekten oder -zellen hergestellt werden, dieses Immunreaktionen auslösende Epitop nicht mehr wie bisher aufweisen.

Die Schrift von John M. Burke "Clearing the way for ribozymes" (Nature Biotechnology 15:414-415; 1997) betrifft die generelle Funktionsweise von Ribozymen.

Die Schrift von Pooga et al "Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo" (Nature Biotechnology 16:857-861; 1998) betrifft PNA-Moleküle allgemein und spezifisch ein PNA-Molekül, das komplementär zur humanen Galaninrezeptortyp 1 mRNA ist.

Die US 5 272 066 A betrifft ein Verfahren zur Veränderung von eukaryotischen und prokaryotischen Proteinen, um ihre in vivo-Zirkulation zu verlängern. Dabei werden die gebundenen Oligosaccharide mit Hilfe von verschiedenen Enzymen, darunter auch die GlcNAc- α 1 \rightarrow 3(4)-Fucosyltransferase verändert.

Die EP 0 643 132 A1 betrifft die Klonierung einer α 1,3-Fucosyltransferase, die aus humanen Zellen (THP-1) isoliert wird. Die in dieser Schrift beschriebenen Kohlenwasserstoffketten entsprechen den menschlichen Sialyl Lewis x- und Sialyl Lewis a-

Oligosacchariden. Die Spezifität des Enzyms aus humanen Zellen ist eine ganz andere als die Fucosyltransferase aus pflanzlichen Zellen.

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, das Gen, das für eine pflanzliche Fucosyltransferase codiert, zu klonieren und zu sequenzieren, Vektoren umfassend dieses Gen, DNA-Stücke davon oder geänderte oder davon abgeleitete DNA herzustellen, Pflanzen und Insekten sowie Zellen davon mit einem dieser Vektoren zu transfektieren, Glykoproteine herzustellen, die die normalerweise vorkommende α 1,3-Core Fucose nicht umfassen, sowie entsprechende Verfahren zur Verfügung zu stellen.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch ein DNA-Molekül, das eine Sequenz gemäß der SEQ ID No: 1 (in dieser Schrift wurde der IUPAC-Code verwendet, wobei "N" für Inosin steht) mit einem offenen Leserahmen von Basenpaar 211 bis Basenpaar 1740 umfasst oder zumindest 50% Homologie zur obengenannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder eine Sequenz umfasst, die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist, wobei die Sequenz für ein pflanzliches Protein mit einer Fucosyltransferase-Aktivität codiert oder dazu komplementär ist.

Diese Sequenz, die zuvor noch nie beschrieben wurde, eignet sich ausgezeichnet für jegliche Experimente, Analysen und Herstellungsverfahren etc., die sich auf die pflanzliche Fucosyltransferase-Aktivität beziehen. Dabei ist sowohl die DNA-Sequenz als auch das von dieser Sequenz codierte Protein von Interesse, wobei aber insbesondere die DNA-Sequenz für die Unterbindung der Fucosyltransferase-Aktivität herangezogen wird.

Der offene Leserahmen der Sequenz mit der SEQ ID No: 1 codiert für ein Protein mit 510 Aminosäuren und mit einem theoretischen Molekulargewicht von 56,8 kDa, wobei im Bereich zwischen Asn36 und Gly54 vermutlich ein transmembranes Stück vorliegt. Der errechnete pi-Wert des codierten Proteins der Sequenz gemäß der SEQ ID No: 1 beträgt 7,51.

Die Aktivität der pflanzlichen Fucosyltransferase wird durch ein Verfahren nachgewiesen und gemessen, wobei die Fucosyltransferase zu einer Probe umfassend markierte Fucose und einen an einen Träger, z.B. Sepharose, gebundenen Akzeptor (z.B. ein Glykoprotein) zugesetzt wird. Nach der Reaktionszeit wird die

- 5 -

Probe gewaschen und der Gehalt an gebundener Fucose gemessen. Die Aktivität der Fucosyltransferase wird dabei als positiv angesehen, wenn die Aktivitätsmessung zumindest um 10 bis 20%, insbesondere zumindest um 30 bis 50% höher liegt als die Aktivitätsmessung der Negativkontrolle. Die Struktur des Glykoproteins kann zusätzlich mittels HPLC verifiziert werden. Solche Protokolle sind Stand der Technik (Staudacher et al. 1998, Anal. Biochem. 246, 96-101; Staudacher et al. 1991, Eur.J. Biochem. 199, 745-751).

Beispielsweise wird Fucosyltransferase zu einer Probe umfassend radioaktiv markierter Fucose und einen Akzeptor, z.B. GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn, zugesetzt. Nach Reaktionszeit wird die Probe durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt und der Gehalt an gebundener Fucose gemessen. Aus der Differenz der gemessenen Radioaktivität der Probe mit Akzeptor und der einer Negativkontrolle ohne Akzeptor kann die Aktivität errechnet werden. Die Aktivität der Fucosyltransferase wird bereits als positiv gewertet, wenn die gemessene Radioaktivität zumindest um 30-40% höher liegt als die gemessene Radioaktivität der Negativprobe.

Die Paarung von zwei DNA-Molekülen kann durch die Wahl der Temperatur und Ionenstärke der Probe verändert werden. Unter stringenten Bedingungen, werden erfindungsgemäß Bedingungen verstanden, die eine exakte, strenge, Bindung ermöglichen. Z.B. werden die DNA-Moleküle in 7% Natrium Dodecyl Sulfat (SDS), 0,5M NaPO₄ pH 7,0; 1mM EDTA bei 50°C hybridisiert und mit 1% SDS bei 42°C gewaschen.

Ob Sequenzen eine zumindest 50% Homologie zur SEQ ID No: 1 aufweisen, kann z.B. mit dem Programm FastDB der EMBL oder SWISSPROT Datenbank ermittelt werden.

Bevorzugterweise codiert die Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls für ein Protein mit einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, insbesondere mit einer Core- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität. Wie oben bereits beschrieben, kommt die Core- α 1,3-Fucosyltransferase in Pflanzen und Insekten, nicht aber im menschlichen Organismus vor, so dass insbesondere diese DNA-Sequenz geeignet ist, in Fucosyltransferase-spezifischen Analysen und Experimenten sowie Produktionsverfahren verwendet zu werden. Unter einer Core- α 1,3-Fucosyltransferase wird insbeson-

dere die GDP-L-Fuc:Asn-gebundene GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase verstanden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist mit der Bezeichnung α 1,3-Fucosyl-transferase in der Regel insbesondere die Core- α 1,3-Fucosyltransferase gemeint. Zur oben beschriebenen Aktivitätsmessung dienen dabei insbesondere Akzeptoren mit einem nicht reduzierenden GlcNAc-Ende. Solche Akzeptoren sind z.B. GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn, GlcNAc β 1-2Man α 1-3(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6GlcNAc β 1-Asn und GlcNAc β 1-2Man α 1-3[Man α 1-6]Man α 1-6]Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn. Ob die Fucose gebunden ist, kann weiters durch Messen der Unempfindlichkeit gegenüber der N-Glykosidase F festgestellt werden, was mit Hilfe der Massenspektrometrie nachgewiesen werden kann.

Bevorzugterweise weist das erfindungsgemäße DNA-Molekül zumindest 70-80%, besonders bevorzugt zumindest 95%, Homologie zur Sequenz gemäß der SEQ ID No: 1 auf. Diese Sequenz codiert für eine besonders aktive GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase. Da die DNA-Sequenz je nach Pflanze bzw. Insekt mehr oder weniger verändert sein kann, weist eine Sequenz, die z.B. 70% Homologie zur Sequenz gemäß der SEQ ID No: 1 aufweist, ebenfalls eine Fucosyltransferase-Aktivität auf, die ausreicht, um für Analysen, Experimente oder Herstellungsverfahren wie oben beschrieben verwendet zu werden.

Nach einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform umfasst das DNA-Molekül 2150 bis 2250, insbesondere 2198, Basenpaare. Dieses DNA-Molekül weist 100 bis 300, vorzugsweise 210, Basenpaare stromaufwärts vor dem Startcodon auf sowie 350 bis 440, insbesondere 458, Basenpaare stromabwärts nach dem Stopcodon des offenen Leserahmens auf, wobei das Ende des DNA-Moleküls vorzugsweise einen 3'-Poly(A)-Schwanz umfasst. Auf diese Weise ist eine einwandfreie Regulation auf dem Niveau der Translation gesichert, und es wird ein DNA-Molekül zur Verfügung gestellt, das besonders effizient und problemlos für eine aktive GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiters ein DNA-Molekül, das eine Sequenz gemäß der SEQ ID No: 3 umfasst oder eine Sequenz umfasst, die zumindest 85%, besonders bevorzugt zumindest 95%, insbesondere zumindest 99%, Homologie zur oben genannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der

- 7 -

oben genannten Sequenz hybridisiert oder die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA Sequenz degeneriert ist. Die Homologie wird vorzugsweise mit einem Programm bestimmt, das Insertionen und Deletionen erkennt und diese nicht in der Homologie-Berechnung berücksichtigt. Diese Nukleotidsequenz codiert für ein konserviertes Peptid-Motiv, d.h. dass die Mehrheit der aktiven und funktionierenden GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen die dadurch codierte Aminosäuresequenz umfasst. Die Sequenz kann dabei sowohl die gleiche Größe wie die Sequenz gemäß der SEQ ID No: 3 aufweisen, oder aber selbstverständlich auch größer sein. Diese Sequenz weist eine geringere Länge auf als die Sequenz, die für das gesamte Protein codiert, und ist somit weniger anfällig für Rekombinationen, Deletionen oder andere Mutationen. Aufgrund des konservierten Motivs und ihrer erhöhten Stabilität eignet sich diese Sequenz besonders gut für Sequenzerkennungs-Tests.

Die SEQ ID No: 3 weist folgende Sequenz auf:

5'-gaagccctgaaggactacaaatttagcttagcggttggaaaattcgaatgaggaag
attatgtaactgaaaaattcttccaatcccttgttgcgttggaaactgtccct -3'

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein DNA-Molekül, das eine Teilsequenz eines der oben genannten DNA-Moleküle umfasst und eine Größe von 20 bis 200, vorzugsweise 30 bis 50, Basenpaaren aufweist. Das DNA-Molekül kann beispielsweise dazu eingesetzt werden, als Sonde an komplementäre Sequenzen von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen zu binden, so dass diese aus einer Probe selektiert werden können. Auf diese Weise können weitere GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen aus den verschiedensten Pflanzen und Insekten selektiert, isoliert und charakterisiert werden. Es können jede beliebige oder auch mehrere verschiedene Teilsequenzen verwendet werden, insbesondere ein Teil des oben schon beschriebenen konservierten Motivs.

Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn eines der oben genannten DNA-Moleküle kovalent mit einer nachweisbaren Markierungssubstanz assoziiert ist. Als Markierungssubstanz kommt jeder gebräuchliche Marker in Frage, so z.B. fluoreszierende, luminiszierende, radioaktive Marker, nicht-isotope Markierungen, wie Biotin, etc. Dadurch werden Reagenzien bereitgestellt, die für den Nachweis, die Selektion und Quantifizierung von entsprechenden DNA-Molekülen in festen Gewebeproben (z.B. von Pflanzen)

oder auch in Flüssigkeitsproben durch Hybridisierungsverfahren nützlich sind.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen biologisch funktionellen Vektor, der eines der oben genannten DNA-Moleküle oder Teile unterschiedlicher Länge davon, mit mindestens 20 Basenpaaren umfasst. Zur Transfektion in Wirtszellen ist ein eigenständiger, vermehrungsfähiger Vektor notwendig, wobei je nach Wirtszelle, Transfektionsmechanismus, Aufgabe und Größe des DNA-Moleküls ein passender Vektor verwendet werden kann. Da eine große Zahl an verschiedenen Vektoren bekannt ist, würde eine Aufzählung den Rahmen der Anmeldung sprengen, so dass hier darauf verzichtet wird, insbesondere, da die Vektoren dem Fachmann bestens bekannt sind (bezüglich Vektoren sowie allen in dieser Schrift verwendeten Techniken und Begriffe, die dem Fachmann bekannt sind, siehe auch Sambrook Maniatis). Idealerweise weist der Vektor eine geringe Molekülmasse auf und sollte selektierbare Gene aufweisen, um in einer Zelle zu einem leicht erkennbaren Phänotyp zu führen, so dass eine einfache Selektion von vektorhältigen und vektorfreien Wirtszellen möglich ist. Um eine hohe Ausbeute an DNA und entsprechenden Genprodukten zu erhalten, sollte der Vektor einen starken Promotor, sowie einen Enhancer, Genamplifikationssignale und Regulatorsequenzen aufweisen. Für eine autonome Replikation des Vektors ist weiters ein Replikationsursprung wichtig. Polyadenylierungsstellen sind für eine korrekte Prozessierung der mRNA und Spleißsignale für die von RNA-Transkripten verantwortlich. Werden Phagen, Viren oder Viruspartikel als Vektoren verwendet, steuern Verpackungssignale die Verpackung der Vektor-DNA. Z.B. sind für die Transkription in Pflanzen Ti-Plasmide geeignet und für die Transkription in Insektenzellen Baculoviren, bzw. in Insekten Transposons, wie das P Element.

Wird der oben beschriebene erfindungsgemäße Vektor in eine Pflanze oder Pflanzenzelle eingeschleust, so wird eine posttranskriptionelle Unterdrückung der Genexpression des endogenen α 1,3-Fucosyltransferase-Gens durch Transkription eines zu diesem homologen Transgens oder Teilen davon in Sense-Orientierung erreicht. Für diese Sense-Technik wird weiters auf die Schriften Baulcombe 1996, Plant.Mol.Biol.. 9:373-382 und Brigneti et al. 1998, EMBO J. 17:6739-6746 verwiesen. Diese Strategie des "Gen-

- 9 -

"Silencing" stellt eine wirkungsvolle Möglichkeit dar, die Expression des α 1,3-Fucosyltransferase-Gens zu unterdrücken, s. auch Waterhouse et al. 1998, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95:13959-13964. —

Weiters betrifft die Erfindung einen biologisch funktionellen Vektor, der ein DNA-Molekül gemäß einem der oben beschriebenen Ausführungsformen oder Teile unterschiedlicher Länge davon in inverser Orientierung zum Promotor umfasst. Wird dieser Vektor in eine Wirtszelle transfektiert, wird eine "Antisense-mRNA" abgelesen, die komplementär zur mRNA der GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferase ist und diese komplexiert. Diese Bindung behindert entweder die korrekte Prozessierung, den Transport, die Stabilität, oder durch Verhinderung der Ribosomenanlagerung die Translation und damit die normale Genexpression der GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferase.

Obwohl die gesamte Sequenz des DNA-Moleküls in den Vektor eingebaut werden könnte, können Teilsequenzen davon aufgrund der geringeren Größe für bestimmte Zwecke vorteilhafter sein. Wichtig ist z.B. beim Antisense-Aspekt, dass das DNA-Molekül groß genug ist, um eine ausreichend große Antisense-mRNA zu bilden, die an die Transferase-mRNA bindet. Beispielsweise umfasst ein geeignetes Antisense-RNA-Molekül 50 bis 200 Nukleotide, da viele der bekannten natürlich vorkommenden Antisense-RNA-Molekülen etwa 100 Nukleotide umfassen.

Für eine besonders effektive Inhibierung der Expression einer aktiven α 1,3-Fucosyltransferase ist eine Kombination der Sense-Technik und Antisense-Technik geeignet (Waterhouse et al. 1998, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95:13959-13964).

Vorteilhafterweise werden schnell hybridisierende RNA-Moleküle eingesetzt. Die Effizienz von Antisense-RNA-Molekülen, die eine Größe von über 50 Nukleotiden aufweisen, hängt von der Anlagerungskinetik in vitro ab. So zeigen z.B. schnell anlagernde Antisense-RNA-Moleküle eine stärkere Inhibition der Proteinexpressierung als langsam hybridisierende RNA-Moleküle (Wagner et al. 1994, Annu. Rev. Microbiol., 48:713-742; Rittner et al. 1993, Nucl. Acids Res, 21:1381-1387). Solche schnell hybridisierenden Antisense-RNA-Moleküle weisen insbesondere eine große Anzahl von externen Basen (freie Enden und Verbindungssequenzen), eine große Anzahl von strukturellen Subdomänen (Komponen-

ten), sowie einen geringen Grad an Schleifen (Patzel et al. 1998; Nature Biotechnology, 16; 64-68) auf. Die hypothetischen Sekundärstrukturen des Antisense-RNA-Moleküls können z.B. mit Hilfe eines Computerprogramms ermittelt werden, gemäß dem eine geeignete Antisense-RNA DNA-Sequenz ausgesucht wird.

Es können unterschiedliche Sequenzregionen des DNA-Moleküls in den Vektor eingebaut werden. Eine Möglichkeit besteht z.B. darin, nur den Teil, der für die Ribosomenanlagerung verantwortlich ist, in den Vektor einzubauen. Eine Blockierung in diesem Bereich der mRNA reicht aus, um die gesamte Translation zu stoppen. Eine besonders hohe Effizienz der Antisense-Moleküle ergibt sich auch für die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des Gens.

Vorzugsweise weist das erfundungsgemäße DNA-Molekül eine Sequenz auf, die eine Deletions-, Insertions- und/oder Substitutionsmutation umfasst. Die Anzahl der mutierten Nukleotide ist dabei variabel und reicht von einem einzigen bis zu mehreren deletierten, inserierten oder substituierten Nukleotiden. Es ist auch möglich, dass durch die Mutation der Leserahmen verschoben ist. Wichtig bei einem derartigen "Knockout-Gen" ist lediglich, dass die Expression einer GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferase gestört ist und die Bildung eines aktiven, funktionellen Enzyms verhindert wird. Dabei ist die Stelle der Mutation variabel, solange die Exprimierung eines enzymatisch aktiven Proteins unterbunden ist. Vorzugsweise ist die Mutation im katalytischen Bereich des Enzyms, der sich im C-terminalen Bereich befindet. Die Verfahren zum Einführen von Mutationen in DNA-Sequenzen sind dem Fachmann bestens bekannt, so dass hier darauf verzichtet wird, näher auf die verschiedenen Möglichkeiten der Mutagenesen einzugehen. Es können sowohl zufällige Mutagenesen aber auch insbesondere zielgerichtete Mutagenesen, z.B. die site-directed-mutagenesis, die oligonukleotidgesteuerte Mutagenese oder Mutagenesen mit Hilfe von Restriktionsenzymen hier zur Anwendung kommen.

Die Erfindung stellt weiters ein DNA-Molekül zur Verfügung, das für ein Ribozym codiert, welches zwei Sequenzabschnitte von jeweils mindestens 10 bis 15 Basenpaaren aufweist, die Sequenzabschnitten eines erfundungsgemäßen DNA-Moleküls wie oben beschrieben komplementär sind, so dass das Ribozym die mRNA komplexiert und schneidet, die von einem natürlichen GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase DNA-Molekül transkribiert wird. Das Ribozym

- 11 -

erkennt die mRNA der GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase durch komplementäre Basenpaarung mit der mRNA. Anschließend schneidet und zerstört das Ribozym die RNA in einer sequenzspezifischen Art, bevor das Enzym translatiert wird. Nach Dissoziation vom geschnittenen Substrat, hybridisiert das Ribozym wiederholt mit RNA-Molekülen und wirkt als spezifische Endonuklease. Generell können Ribozyme spezifisch zur Inaktivierung einer bestimmten mRNA hergestellt werden, selbst wenn nicht die gesamte DNA-Sequenz, die für das Protein codiert, bekannt ist. Ribozyme sind besonders dann effizient, wenn die Ribosomen langsam an der mRNA entlang gleiten. In diesem Fall ist es für das Ribozyt leichter, eine Ribosomen-freie Stelle an der mRNA zu finden. Aus diesem Grund sind langsame Ribosomen-Mutante als System für Ribozyme ebenfalls geeignet (J.Burke, 1997, Nature Biotechnology; 15, 414-415). Dieses DNA-Molekül eignet sich besonders gut für die Unterdrückung bzw. Unterbindung der Expression einer pflanzlichen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase.

Eine Möglichkeit besteht auch darin, eine abgewandelte Form eines Ribozys einzusetzen, nämlich ein Minizym. Insbesondere für das Schneiden von größeren mRNA-Molekülen sind Minizyme effizient. Ein Minizym ist ein Hammerkopf-Ribozym, das anstelle der Stem/Loop II einen kurzen Oligonukleotid-Linker aufweist. Besonders effizient sind Dimer-Minizyme (Kuwabara et al. 1998, Nature Biotechnology, 16; 961-965).

Demnach betrifft die Erfindung ebenfalls einen biologisch funktionellen Vektor, der eines der beiden zuletztgenannten DNA-Moleküle (Mutations oder Ribozym-DNA-Molekül) umfasst. Hierbei gilt das oben bezüglich Vektoren bereits Beschriebene. Ein solcher Vektor kann z.B. in einen Mikroorganismus eingeschleust und für die Herstellung von hohen Konzentrationen der oben beschriebenen DNA-Moleküle verwendet werden. Weiters ist ein solcher Vektor besonders gut für die Einschleusung des spezifischen DNA-Moleküls in einen pflanzlichen oder Insekten-Organismus geeignet, um die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Produktion in diesem Organismus einzuschränken oder völlig zu unterbinden.

Gemäß der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung einer cDNA umfassend das erfindungsgemäße DNA-Molekül zur Verfügung gestellt, wobei RNA aus Insekten- bzw. pflanzlichen Zellen, insbesondere aus Hypokotyl-Zellen, isoliert wird, mit der nach

- 12 -

Zusetzen einer reversen Transkriptase und Primern eine reverse Transkription durchgeführt wird. Die einzelnen Schritte dieses Verfahrens werden nach Protokollen wie an sich bekannt durchgeführt. Für die reverse Transkription besteht einerseits die Möglichkeit, mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern die cDNA der gesamten mRNA herzustellen und erst anschließend mit ausgewählten Primern eine PCR durchzuführen, um DNA-Moleküle umfassend das GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Gen herzustellen. Andererseits können die ausgewählten Primer direkt für die reverse Transkription eingesetzt werden, um eine kurze, spezifische cDNA zu erhalten. Die geeigneten Primer können z.B. synthetisch nach Vorlage von cDNA-Sequenzen der Transferase hergestellt werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens können sehr rasch und einfach, mit geringer Fehlerquote, große Mengen an erfindungsgemäßen cDNA-Molekülen hergestellt werden.

Die Erfindung betrifft weiters ein Verfahren zum Klonieren einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, dadurch gekennzeichnet, dass das erfindungsgemäße DNA-Molekül in einen Vektor kloniert wird, der anschließend in eine Wirtszelle bzw. einen Wirt transfektiert wird, wobei durch Selektion und Amplifikation von transfektierten Wirtszellen Zelllinien erhalten werden, die die aktive GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase exprimieren. Das DNA-Molekül wird beispielsweise mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in den Vektor eingefügt. Für den Vektor gilt wiederum das oben bereits angeführte. Wichtig ist bei diesem Verfahren, dass ein effizientes Wirt-Vektor System gewählt wird. Um ein aktives Enzym zu erhalten sind eukaryotische Wirtszellen besonders geeignet. Eine Möglichkeit besteht darin, den Vektor in Insekten-Zellen zu transfektieren. Dabei wäre insbesondere ein Insektenvirus als Vektor zu verwenden, so z.B. Baculovirus.

Selbstverständlich können menschliche oder ander Wirbeltierzellen ebenfalls transfektiert werden, wobei diese ein ihnen fremdes Enzym exprimieren würden.

Bevorzugterweise wird ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, bzw. Pflanzen oder Insekten mit einer unterdrückten bzw. vollständig unterbundenen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Produktion zur Verfügung gestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass zumindest einer der erfindungsgemäßen Vektoren, nämlich der

- 13 -

umfassend das erfindungsgemäße DNA-Molekül, das mutierte DNA-Molekül oder das DNA-Molekül, das für Ribozyme codiert oder der umfassend das DNA-Molekül in inverser Orientierung zum Promotor, in die Wirtszelle bzw. Pflanze oder in das Insekt eingeschleust wird. Hier gilt ebenfalls das oben für die Transfektion bereits Beschriebene.

Als Wirtszellen können z.B. Pflanzenzellen verwendet werden, wobei hier beispielsweise das Ti-Plasmid mit dem Agrobacterium-System in Frage kommt. Es ist mit dem Agrobakterium-System möglich, direkt eine Pflanze zu transfektieren: Agrobakterien verursachen bei Pflanzen Wurzelhalsgallen. Wenn Agrobakterien eine verletzte Pflanze infizieren, gelangen die Bakterien selbst nicht in die Pflanze, sondern sie schleusen den rekombinanten DNA- Abschnitt, die sogenannte T-DNA aus dem ringförmigen, extrachromosomal, tumorinduzierenden Ti-Plasmid in die Pflanzenzellen ein. Die T-DNA, und damit auch das darin eingefügte DNA-Molekül, wird stabil in die chromosomale DNA der Zelle eingebaut, so dass die Gene der T-DNA in der Pflanze exprimiert werden.

Es gibt zahlreiche bekannte, effiziente Transfektionsmехanismen für verschiedene Wirtssysteme. Einige Beispiele sind Elektroporation, die Calciumphosphatmethode, Mikroinjektion, Liposomenmethode.

Die transfektierten Zellen werden anschließend selektiert, z.B. aufgrund von Antibiotika-Resistenzen, für die der Vektor Gene aufweist, oder anderer Markergene. Danach werden die transfektierten Zelllinien amplifiziert, entweder in kleineren Mengen, z.B. in Petrischalen, oder in großen Mengen, etwa in Fermentoren. Weiters weisen Pflanzen eine besondere Eigenschaft auf, sie sind nämlich in der Lage sich aus einer (transfektierten) Zelle bzw. aus einem Protoplasten zu einer vollständigen Pflanze wieder zu entwickeln, die gezüchtet werden kann.

Je nach eingesetztem Vektor kommt es zu Vorgängen im Wirt, so dass die Enzym-Expression unterdrückt oder vollständig unterbunden wird:

Wird der Vektor umfassend das DNA-Molekül mit der Deletions-Insertions- oder Substitutionsmutation transfektiert, so kommt es zu einer homologen Rekombination : Das mutierte DNA-Molekül erkennt trotz Mutation die identische Sequenz im Genom der

Wirtszelle und wird an genau der Stelle eingebaut, so dass ein "Knockout-Gen" entsteht. Auf diese Weise wird in das Gen für die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase eine Mutation eingebracht, die die einwandfreie Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase inhibieren kann. Wie oben schon dargelegt ist es bei dieser Technik wichtig, dass die Mutation ausreicht, um die Expression des aktiven Proteins zu unterbinden. Nach Selektion und Amplifikation kann als zusätzliche Überprüfung das Gen sequenziert werden, um den Erfolg der homologen Rekombination bzw. den Grad der Mutation festzustellen.

Wird der Vektor umfassend das DNA-Molekül, das für ein Ribozym codiert, transfektiert, so wird in der Wirtszelle das aktive Ribozym exprimiert. Das Ribozym komplexiert die komplementäre mRNA Sequenz der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zumindest an einer bestimmten Stelle, schneidet diese Stelle und kann auf diese Weise die Translation des Enzyms inhibieren. In dieser Wirtszelle sowie in den von ihr abstammenden Zelllinien bzw. gegebenenfalls Pflanze wird keine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase exprimiert.

Im Falle des Vektors umfassend das erfindungsgemäße DNA-Molekül in Sense- oder inverser Richtung zum Promotor, wird in der transfektierten Zelle (bzw. Pflanze) eine Sense- oder Antisense-mRNA exprimiert. Die Antisense-mRNA ist komplementär zu zumindest einem Teil der mRNA-Sequenz der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase und kann ebenfalls die Translation des Enzyms inhibieren. Als Beispiel für ein Verfahren zur Unterdrückung der Expression eines Gens durch Antisense-Technik wird auf die Schrift Smith et al. 1990, Mol.Gen.Genet. 224:477-481 verwiesen, wobei in dieser Schrift die Expression eines Gens, das im Reifungsprozess bei Tomaten involviert ist, inhibiert wird.

In allen Systemen wird die Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zumindest unterdrückt, vorzugsweise sogar vollständig unterbunden. Der Grad der Störung der Genexpression hängt vom Grad der Komplexierung, homologen Rekombination, von eventuellen anschließenden zufälligen Mutationen, und sonstigen Vorgängen im Bereich des Genoms ab. Die transfektierten Zellen werden auf GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase Aktivität überprüft und selektiert.

Es besteht weiters die Möglichkeit, die oben beschriebene

Unterdrückung der Expression der α 1,3-Fucosyltransferase noch weiter zu verstärken, indem zusätzlich zur Einschleusung eines oben beschriebenen Vektors, ein Vektor umfassend ein Gen, das für ein Säugetier-Protein, z.B. β 1,4-Galaktosyltransferase, codiert, in den Wirt eingeschleust wird. Die Fukosylierung kann durch die Wirkung anderer Säugetier-Enzyme vermindert werden, wobei die Kombination der Inhibierung der Exprimierung einer aktiven α 1,3-Fucosyltransferase mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Vektors und mit Hilfe eines Säugetier-Enzym-Vektors besonders effizient ist.

Für die Transfektion kann jegliche Pflanzensorte eingesetzt werden, beispielsweise die Mungo Bohne, Tabakpflanze, Tomaten- und/oder Kartoffelpflanze.

Ein anderes, vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen bzw. Pflanzen oder Insekten, besteht darin, dass das DNA-Molekül umfassend die Mutation in das Genom der Wirtszelle bzw. Pflanze oder des Insekts an der Stelle der nichtmutierten, homologen Sequenz eingeschleust wird (Schaefer et al. 1997, Plant J.; 11(6):1195-1206). Dieses Verfahren funktioniert demnach nicht mit einem Vektor, sondern mit einem reinen DNA-Molekül. Das DNA-Molekül wird z.B. durch Genbombardement, Mikroinjektion oder Elektroporation, um nur drei Beispiele zu nennen, in den Wirt eingeschleust. Wie oben bereits dargelegt, legt sich das DNA-Molekül an die homologe Sequenz im Genom des Wirten an, so dass es zu einer homologen Rekombination und damit zur Aufnahme der Deletions-, Insertions- bzw. Substitutionsmutation im Genom kommt: Die Exprimierung der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase kann unterdrückt bzw. vollständig unterbunden werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie Insekten bzw. Insektenzellen, wobei ihre GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in natürlichen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen und Insekten bzw. Insektenzellen vorkommende GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität beträgt. Der Vorteil dieser Pflanzen bzw. Pflanzenzellen liegt darin, dass die Glycoproteine, die von ihnen produziert werden, keine bzw. kaum α 1,3-gebundene Fucose aufweisen. Werden nun Produkte dieser Pflanzen bzw. Insekten vom menschlichen oder Wirbeltier-Körper aufgenommen,

men, kommt es zu keiner Immunreaktion gegen das α 1,3-Fucose-Epitop.

Vorzugsweise werden rekombinante Pflanzen bzw. Pflanzenzellen zur Verfügung gestellt, die nach einem der oben beschriebenen Verfahren hergestellt sind und dass ihre GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.

Die Erfindung betrifft ebenfalls rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, die nach einem der oben beschriebenen Verfahren hergestellt sind und dass ihre GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist. Auch hier werden keine Glykoproteine mit α 1,3-gebundenen Fucoseresten produziert, so dass es ebenfalls zu keiner Immunreaktion gegen das α 1,3-Fucose-Epitop kommt.

Die Erfindung bezieht sich auch auf ein PNA-Molekül, das eine Basensequenz umfasst, die komplementär zur Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls sowie Teilsequenzen davon ist. PNA (Peptid Nukleinsäure) ist eine DNA ähnliche Sequenz, wobei die Nukleobasen an ein Pseudopeptidrückgrat gebunden sind. PNA hybridisiert im allgemeinen mit komplementären DNA-, RNA- oder PNA-Oligomeren durch Watson-Crick Basenpaarung und Helixformation. Das Peptidrückgrat gewährleistet eine größere Resistenz gegenüber enzymatischer Degradation. Das PNA-Molekül stellt dadurch ein verbessertes Antisense-Agens dar. Weder Nuklease noch Proteasen sind in der Lage, ein PNA-Molekül anzugreifen. Die Stabilität des PNA-Moleküls, wenn es an eine komplementäre Sequenz gebunden ist, weist eine ausreichende sterische Blockierung von DNA und RNA Polymerasen, der reversen Transkriptase, Telomerase und der Ribosome.

Weist das PNA-Molekül die oben genannte Sequenz auf, so bindet sie an die DNA bzw. an ein Stelle der DNA, die für GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codiert, und kann auf diese Weise die Transkription dieses Enzyms inhibieren. Das PNA-Molekül, da es weder transkribiert noch translatiert wird, wird synthetisch hergestellt, z.B. mit Hilfe der t-Boc-Technik.

Vorteilhafterweise wird ein PNA-Molekül zur Verfügung gestellt, das eine Basensequenz umfasst, die der Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls sowie Teilsequenzen davon entspricht. Dieses PNA-Molekül komplexiert die mRNA bzw. eine

Stelle der mRNA der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, so dass die Translation des Enzyms inhibiert ist. Hier trifft ähnliches, wie für die Antisense-RNA zu. So ist z.B. ein besonders effizienter Komplexierungsbereich die Translationsstart-Region oder auch die 5'-nichttranslatierten Regionen der mRNA.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, die eine blockierte Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase auf dem Niveau der Transkription bzw. Translation aufweisen, das dadurch gekennzeichnet ist, dass erfindungsgemäße PNA-Moleküle in die Zellen eingeschleust werden. Um das PNA-Molekül bzw. die PNA-Moleküle in die Zelle einzuschleusen, werden wiederum die herkömmlichen Methoden, wie z.B. Elektroporation oder Mikroinjektion angewandt. Besonders effizient ist das Einschleusen, wenn die PNA-Oligomere an Zellen-Penetrationspeptide, z.B. Transportan oder pAntp, gebunden sind (Pooga et al. 1998, Nature Biotechnology, 16; 857-861).

Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Glykoproteinen zur Verfügung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die erfindungsgemäßen, rekombinanten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, deren GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Produktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist, oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, in die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren PNA-Moleküle eingeschleust sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert sind, so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden. Dabei werden wie oben schon beschriebene Vektoren umfassend Gene für die gewünschten Proteine in den Wirt bzw. Wirtszellen wie ebenfalls oben schon beschrieben transfektiert. Die transfektierten Pflanzen- oder Insektenzellen exprimieren die gewünschten Proteine, wobei sie keine oder kaum α 1,3-gebundene Fucose aufweisen. Dadurch lösen sie die oben bereits erwähnten Immunreaktionen im menschlichen oder Wirbeltier-Körper nicht aus. Es können jegliche Proteine in diesen Systemen produziert werden.

Vorzugsweise wird ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen zur Verfügung gestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die erfindungsgemäßen, rekombin-

anten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, deren GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist, oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, in die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren PNA-Moleküle eingeschleust sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert sind, so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden. Durch dieses Verfahren wird es möglich, menschliche Proteine in Pflanzen(zellen) zu produzieren, die, wenn sie durch den menschlichen Körper aufgenommen sind, keine gegen α 1,3-gebundene Fucosereste gerichtete Immunreaktion auslösen. Dabei besteht die Möglichkeit, Pflanzensorten zur Produktion der rekombinanten Glykoproteine einzusetzen, die als Nahrungsmittel dienen, z.B. Banane, Kartoffel und/oder Tomate. Die Gewebe dieser Pflanze umfassen das rekombinante Glykoprotein, so dass z.B. durch Extraktion des rekombinanten Glykoproteins aus dem Gewebe und anschließende Verabreichung bzw. direkt durch den Verzehr des pflanzlichen Gewebes das rekombinante Glykoprotein in den menschlichen Körper aufgenommen wird.

Bevorzugterweise ist dabei ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen zur medizinischen Verwendung, das die erfindungsgemäßen, rekombinanten Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sowie rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, deren GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Produktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist, oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, in die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren PNA-Moleküle eingeschleust sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert sind, so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden. Hierbei kommt jegliches Protein in Frage, das medizinisch von Interesse ist.

Weiters betrifft die vorliegende Erfindung rekombinante Glykoproteine, wobei sie gemäß einem oben beschriebenen Verfahren in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und wobei ihre Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in den nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist. Vorzuziehen sind natürlich Glykoproteine, die keine α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweisen. Die Menge an α 1,3-gebundener

Fucose ist abhängig von dem Grad der oben beschriebenen Unterdrückung der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase.

Bevorzugterweise betrifft die Erfindung rekombinante humane Glykoproteine, die gemäß einem oben beschriebenen Verfahren in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden, und die in ihrer Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in den nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweisen.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform betrifft rekombinante humane Glykoproteine zur medizinischen Verwendung, die gemäß einem oben beschriebenen Verfahren in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden, und die in ihrer Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in den nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweisen.

Diese erfindungsgemäßen Glykoproteine können andere gebundene Oligosaccharid-Einheiten, die für Pflanzen bzw. Insekten spezifisch sind, aufweisen, wodurch sie sich - im Falle von humanen Glykoproteinen - von diesen natürlichen Glykoproteinen unterscheiden. Nichtsdestotrotz werden durch die erfindungsgemäßen Glykoproteine eine geringere bzw. gar keine Immunreaktion im menschlichen Körper ausgelöst, da, wie in der Beschreibungseinleitung schon dargestellt, die α 1,3-gebundenen Fucose-Reste die Hauptursache der Immunreaktionen bzw. Kreuz-Immunreaktionen gegen pflanzliche und Insekten-Glykoproteine sind.

Ein weiterer Aspekt umfasst eine pharmazeutische Zusammensetzung, die die erfindungsgemäßen Glykoproteine umfasst. Zusätzlich zu den erfindungsgemäßen Glykoproteinen umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung weitere, für solche Zusammensetzungen übliche Zusätze. Dies sind z.B. geeignete Verdünnungsmittel verschiedenster Puffergehalts (z.B. Tris-HCl, Acetat, Phosphat), pH und Ionenstärke, Additive, wie etwa Tenside und Löslichmacher (z.B. Tween 80, Polysorbate 80), Konservierungsmittel (z.B. Thimerosal, Benzylalkohol), Adjunktien, Antioxidationsmittel (z.B. Ascorbinsäure, Natriummetabisulfit), Emulgatoren, Füllstoffe (z.B. Lactose, Mannitol), kovalente Bindung von Polymeren, wie etwa Polyethylenglykol, an das Protein, Einbau des

Materials in teilchenförmige Zubereitungen von polymeren Verbindungen, wie etwa Polymilchsäure, Polyglykolsäure, etc oder in Liposome, Hilfsstoffe und/oder Trägerstoffe, die bei der jeweiligen Behandlung nützlich sind. Solche Zusammensetzungen werden den physikalischen Zustand, die Stabilität, die Geschwindigkeit der in-vivo Freisetzung und die Geschwindigkeit der in-vivo Ausscheidung der erfindungsgemäßen Glykoproteine beeinflussen.

Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Selektieren von DNA-Molekülen zur Verfügung, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, in einer Probe, wobei die erfindungsgemäßen, markierten DNA-Moleküle zur Probe zugesetzt werden, die an die DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, binden. Die hybridisierten DNA-Moleküle können detektiert, quantifiziert und selektiert werden. Damit die Probe Einzelstrang-DNA aufweist, mit der die markierten DNA-Moleküle hybridisieren können, wird die Probe, z.B. durch Erwärmen, denaturiert.

Eine Möglichkeit besteht darin, die zu untersuchende DNA, eventuell nach Zusetzen von Endonukleasen, durch Gelelektrophorese auf einem Agarosegel zu trennen. Nach Überführen auf eine Membran aus Nitrozellulose werden die erfindungsgemäßen markierten DNA-Moleküle zugesetzt, die an das entsprechende homologe DNA-Molekül hybridisieren ("Southern Blotting").

Eine andere Möglichkeit besteht darin, homologe Gene aus anderen Spezies durch PCR-abhängige Verfahren unter Verwendung von spezifischen und/oder degenerierten Primern, abgeleitet aus der Sequenz des erfindungsgemäßen DNA-Moleküls, aufzufinden.

Bevorzugt umfasst die Probe für das obengenannte erfinderische Verfahren genomische DNA eines pflanzlichen bzw. Insekten-Organismus. Durch dieses Verfahren wird auf sehr schnelle und effiziente Weise eine große Anzahl von Pflanzen und Insekten auf das Vorhandensein des GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Gens untersucht. Auf diese Weise können Pflanzen und Insekten, die dieses Gen nicht aufweisen, selektiert werden bzw. können in solchen Pflanzen und Insekten, die dieses Gen aufweisen, durch ein oben beschriebenes, erfindungsgemäßes Verfahren die Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase unterdrückt bzw. vollständig unterbunden werden, so dass sie anschließend zur Transfektion und Produktion von (humanen) Glykoproteinen eingesetzt werden

können.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, die nach den zwei zuletzt genannten Verfahren selektiert und anschließend aus der Probe isoliert wurden. Diese Moleküle können für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Sie können sequenziert und ihrerseits auch als DNA-Sonden zum Auffinden von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferasen verwendet werden. Diese - markierten - DNA-Moleküle werden für Organismen, die den Organismen, aus denen sie isoliert wurden, verwandt sind, effizienter als Sonden fungieren, als die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine Präparation von erfindungsgemäß klonierter GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, die Isoformen mit pI-Werten zwischen 6.0 und 9.0, insbesondere zwischen 6.8 und 8.2, aufweist. Der pI-Wert eines Proteins ist derjenige pH-Wert, bei dem seine Nettoladung Null beträgt und ist abhängig von der Aminosäuresequenz, dem Glykosylierungsmuster als auch von der räumlichen Struktur des Proteins. Die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase umfasst zumindest 7 Isoformen, die einen pI-Wert in diesem Bereich aufweisen. Der Grund für die verschiedenen Isoformen der Transferase sind z.B. unterschiedliche Glykosylierungen sowie limitierte Proteolyse. Versuche zeigten, dass Mungobohnen-Sämlinge von verschiedenen Pflanzen unterschiedliche Verhältnisse der Isozyme aufweisen. Der pI-Wert eines Proteins kann durch isoelektrische Fokussierung, die dem Fachmann bekannt ist, festgestellt werden.

Die Haupt-Isoform des Enzyms weist ein apparentes Molekulargewicht von 54 kDa auf.

Insbesondere weist die erfindungsgemäße Präparation Isoformen mit pI-Werten von 6.8, 7.1 und 7.6 auf.

Die Erfindung betrifft ebenso ein Verfahren zur Herstellung von "verpflanzlichen" Kohlenhydrat-Einheiten von menschlichen und anderen Wirbeltier-Glykoproteinen, wobei zu einer Probe, die eine Kohlenhydrat-Einheit bzw. ein Glykoprotein umfasst, Fucose-Einheiten sowie von einem oben beschriebenen DNA-Molekül codierte GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zugesetzt werden, so dass Fucose in α 1,3-Stellung durch die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase an die Kohlenhydrat-Einheit bzw. das Glykoprotein gebunden wird. Durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Klonierung von GlcNAc-

α 1,3-Fucosyltransferase ist es möglich, große Mengen gereinigtes Enzym herzustellen. Um eine voll aktive Transferase zu erhalten, werden geeignete Reaktionsbedingungen hergestellt. Es hat sich gezeigt, dass die Transferase eine besonders hohe Aktivität bei einem pH-Wert von etwa 7 aufweist, wenn als Puffer 2- (N-Morpholino)Ethansulfonsäure-HCl verwendet wird. In Gegenwart von bivalenten Kationen, insbesondere Mn²⁺, wird die Aktivität der rekombinannten Transferase verstärkt. Die Kohlenhydrat-Einheit wird entweder in ungebundener Form oder an ein Protein gebunden zur Probe zugesetzt. Die rekombinante Transferase ist für beide Formen aktiv.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren, auf die sie selbstverständlich nicht eingeschränkt ist, weiter erläutert werden. Im einzelnen zeigen in der Zeichnung die Fig. 1a und 1b die gemessenen Mengen an Protein und die gemessene Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen des Eluats als Kurven; die Fig. 2 die Abbildung eines Elektrophorese-Gels der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase; die Fig. 3 das Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung und die gemessene Transferase-Aktivität der einzelnen Isoformen; die Fig. 4 die N-terminalen Sequenzen von 4 tryptischen Peptiden 1 - 4 sowie die DNA-Sequenz von drei Primern S1, A2 und A3; die Fig. 5a und 5b die cDNA-Sequenz der α 1,3-Fucosyltransferase; die Fig. 6a und 6b die daraus hergeleitete Aminosäuresequenz der α 1,3-Fucosyltransferase; die Fig. 7 eine schematische Darstellung der α 1,3-Fucosyltransferase sowie die Hydrophobizität der Aminosäuren-Reste; die Fig. 8 einen Vergleich der konservierten Motive verschiedener Fucosyltransferasen; die Fig. 9 einen Vergleich der Fucosyltransferase-Aktivität von mit dem α 1,3-Fucosyltransferase-Gen transfektierten Insektenzellen mit einer Negativkontrolle; die Fig. 10a und 10b Strukturen von verschiedenen Akzeptoren der α 1,3-Fucosyltransferase; die Fig. 11 und 12 Massenspektren; und die Fig. 13 das Ergebnis einer HPLC.

Beispiel 1:

Isolieren der Core- α 1,3-Fucosyltransferase

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Mungobohnen-Sämlinge

wurden in einem Mixer homogenisiert, wobei 0.75 Volumen Extraktionspuffer pro kg Bohnen verwendet wurde. Das Homogenisat wurde anschließend durch zwei Lagen Baumwollstoff filtriert und das Filtrat wurde bei 30000xg 40 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit Lösungspuffer über Nacht bei ständigem Rühren extrahiert. Anschließende Zentrifugation bei 30000xg für 40 min ergab den Triton-Extrakt.

Der Triton-Extrakt wurde wie folgt gereinigt:

Schritt 1: Der Triton-Extrakt wurde auf einen mikrogranulären Diäthylaminoäthyl-Zellulose-Anionenaustauscher DE52 Zellulose-Säule (5x28 cm, Fa. Whatman), der zuvor mit Puffer A kalibriert wurde, aufgetragen. Die nicht gebundene Fraktion wurde in Schritt 2 weiterbehandelt.

Schritt 2: Die Probe wurde auf eine mit Puffer A kalibrierte Affi-Gel Blue Säule (2.5x32) Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit diesem Puffer wurde adsorbierter Protein mit Puffer A umfassend 0.5 M NaCl eluiert.

Schritt 3: Nach Dialyse des Eluats aus Schritt 2 gegen Puffer B wurde es auf eine, mit demselben Puffer kalibrierte, S-Sepharose-Säule aufgetragen. Gebundenes Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0.5 M NaCl in Puffer B eluiert. Fraktionen mit GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase wurden gepoolt und gegen Puffer C dialysiert.

Schritt 4: Die dialysierte Probe wurde auf eine mit Puffer C kalibrierte GnGn-Sepharose-Säule aufgetragen. Das gebundene Protein wurde mit Puffer C umfassend 1 M NaCl anstelle von MnCl₂ eluiert.

Schritt 5: Das Enzym wurde anschließend gegen Puffer D dialysiert und auf eine GDP-Hexanolamin-Sepharose-Säule aufgebracht. Nach Waschen der Säule mit Puffer D wurde die Transferase durch Ersetzen von MgCl₂ und NaCl mit 0.5 mM GDP eluiert. Aktive Fraktionen wurden gepoolt, gegen 20 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.3, dialysiert und lyophilisiert.

Die enzymatische Aktivität der GlcNAc α 1,3 Fucosyltransferase wurde durch Verwendung von GnGn-Peptid und GDP-L-[U-¹⁴C] Fucose bei Substratkonzentrationen von jeweils 0.5 und 0.25, in Gegenwart von 2-(N-Morpholin)Ethansulfonsäure-HCl Puffer, Triton X-100, MnCl₂, GlcNAc und AMP bestimmt (gemäß Staudacher et al. 1998 Glycoconjugate J. 15, 355-360; Staudacher et al. 1991

Eur.J.Biochem. 199, 745-751).

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Bichinchoninsäure Methode (Pierce) oder, bei den letzten Schritten der Enzymreinigung, mittels Aminosäurenanalyse bestimmt (Altmann 1992 Anal.Biochem. 204, 215-219).

In Fig 1a und 1b sind die gemessenen Mengen an Protein und die gemessene Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen des Eluats als Kurven dargestellt. Fig. 1a zeigt die oben beschriebene Trennung auf der S-Sepharose Säule, Fig. 1 b die Trennung auf der GnGn-Sepharose-Säule, wobei der Kreis Protein, der schwarze, volle Kreis GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase und das Viereck N-Acetyl- β -Glucosaminidase darstellt. Ein U ist definiert als die Menge Enzym, die 1 μ mol Fucose auf einen Akzeptor pro Minute transferiert.

Tabelle 1 zeigt die einzelnen Schritte der Transferaser-Reinigung.

Tabelle 1

Reinigungsschritt	Ges. Prot.	Ges. Aktiv.	Spez. Aktiv.	Reinigungs Faktor	Ausbeute %
	mg	mU	mU/mg	-fach	
Triton X-100					
Extrakt	91500	4846	0.05	1	100
DE52	43700	4750	0.10	2	98.0
Affigel Blue	180.5	4134	23	460	85.3
S-Sepharose	8.4	3251	390	7800	67.1
GnGn-Sepharose	0.13 ¹	1044	8030	160000	21.5
GDP-Hexanolamin-Sepharose	0.02 ¹	867	43350	867000	17.9

¹ wurde mittels Aminosäure-Analyse ermittelt

Extraktionspuffer:

0.5 mM Dithiothreit
1 mM EDTA
0.5 % Polyvinylpolypyrrrolidon
0.25 M Saccharose
50 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.3

Lösungspuffer:

0.5 mM Dithiothreit
1 mM EDTA
1.5% Triton X-100
50 mM Tris-HCl, pH 7.3

Puffer A:

25mM Tris-HCl Puffer, pH 7.3 mit:
0.1% Triton X-100 und
0.02% NaN₃

Puffer B:

25 mM Na-Citrat Puffer, pH 5.3 mit:
0.1% Triton X-100 und
0.02% NaN₃

Puffer C:

25 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.3 mit:
5 mM MnCl₂, und
0.02% NaN₃

Puffer D.

25 mM Tris-HCl, pH 7.3 mit:
10 mM MgCl₂,
0.1 M NaCl und
0.02% NaN₃

Beispiel 2:**SDS-Page und isoelektrische Fokussierung**

Eine SDS-Page wurde in einer Biorad-Mini-Protean-Zelle auf Gelen mit 12.5% Acrylamid und 1% Bisacrylamid durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie Brilliant Blau R-250 oder Silber gefärbt. Isoelektrische Fokussierung der Fucosyltransferase wurde auf vorgefertigten Gelen mit einem pI-Bereich zwischen 6-9 (Servalyt precotes 6-9, Serva) durchgeführt. Die Gele

wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers mit Silber gefärbt. Für die zweidimensionale Elektrophorese wurden Banden aus dem Fokussierungsgel ausgeschnitten, mit S-Alkylierungs-Reagentien und SDS behandelt und einer SDS-Page, wie oben beschrieben, unterzogen.

Fig. 2 stellt die Abbildung eines Elektrophorese-Gels der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase dar, wobei links die zweidimensionale Elektrophorese und rechts die eindimensionale SDS-Page dargestellt sind. Dabei ist die mit A bezeichnete Bahn ein Standard, die mit B bezeichnete Bahn die GlcNAc α 1,3-Fucosyltransferase aus der GnGn-Sepharose-Säule und die mit C bezeichnete Bahn "gereinigte" GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, d.h. die Fraktion der GDP-Hexanolamin-Sepharose-Säule. Die zwei Banden bei 54 und 56 kDa stellen Isoformen der Transferase dar.

Fig. 3 zeigt das Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung. Bahn A wurde mit Silber gefärbt, auf Bahn B wurde Aktivität der Transferase Isoformen getestet. Die Aktivität ist dabei als % Fucose angegeben, die GDP-Fucose auf das Substrat transferiert wurde.

Beispiel 3:

Peptidsequenzierung

Für die Sequenzierung des Proteins wurden Banden aus dem mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel geschnitten, carboxyamidomethyliert und mit Trypsin gemäß Görg et al. 1988, Electrophoresis, 9, 681-692, gespalten. Die tryptischen Peptide wurden mit der reversen Phase HPLC auf einer 1.0x250 mm Vydac C18 bei 40°C mit einer Durchflussrate von 0.05 ml/min getrennt, wobei ein HP 1100 Apparat (Hewlett-Packard) verwendet wurde. Die isolierten Peptide wurden mit Hewlett-Packard G1005A Protein Sequenzierungs System gemäß dem Protokoll des Herstellers sequenziert. Weiters wurde die Peptidmischung durch Ingel-Verdauung mit MALDI-TOF MS analysiert (siehe unten).

Fig. 4 zeigt die N-terminalen Sequenzen von 4 tryptischen Peptiden 1 - 4 (SEQ ID No: 5-8). Ausgehend von den ersten drei Peptiden wurden Primer S1, A2 und A3 hergestellt (Sequenz-Identifikationsnummern 9-11).

Beispiel 4:

RT-PCR und cDNA Klonieren

Die gesamte RNA wurde aus einem 3 Tage alten Mungo Bohnen Hypokotyl isoliert, wobei das SV Total RNA Isolierungs System von Promega verwendet wurde. Zur Herstellung der Erststrang-cDNA wurde die gesamte RNA 1 h bei 48°C mit AMV reverse Transkriptase und Oligo(dT) Primern inkubiert, wobei das Reverse Transkription System von Promega verwendet wurde.

Die Erststrang-cDNA wurde einer PCR unterzogen, wobei eine Kombination von Sense- und Antisense-Primern verwendet wurde:

Zu 10 µl der reversen Transkription Reaktion wurde folgendes zugesetzt:

50 µl mit 0.1µmol eines jeden Primers, 0.1 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl Puffer, pH 9.0, 50 mM KCl und 0.1 % Triton X-100.

Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 95°C für 2 min, wurden 40 Zyklen von 1 min bei 95°C, 1 min bei 49°C und 2 min bei 72°C durchlaufen. Der letzte Extensionsschritt wurde bei 72°C für 8 min durchgeführt. PCR Produkte wurden in den pCR2.1 Vektor subkloniert, wobei das TA Cloning Kit von Invitrogen verwendet wurde, und sequenziert. Die Produkte dieser PCR waren zwei DNA-Fragmente mit der Länge von 744bp und 780bp, wobei beide DNA-Fragmente dasselbe 5'-Ende aufweisen (s. auch Fig.7).

Ausgehend von diesen zwei DNA-Fragmenten wurden die fehlenden 5' und 3' Regionen der cDNA durch 5'- und 3'- Rapid Amplifikation von cDNA-Enden (RACE) erhalten, wobei der RACE Kit von Gibco-BRL verwendet wurde. Als Antisense-Primer wurde der universelle Amplifikations-Primer des Kits und als Sense-Primer entweder 5'-CTGGAACTGTCCCTGTGGTT-3' (SEQ ID No: 12) oder 5'-AGTGCACTAGAGGCCAGAA-3' (SEQ ID No: 13) verwendet. Es wurde auch als Sense Primer der verkürzte Anker-Primer des Kits und als Antisense-Primer 5'-TTCGAGCACCAATTGGAAAT-3' (SEQ ID No: 14) oder 5'-GAATGCAAAGACGGCACGATGAAT-3' (SEQ ID No: 15) verwendet.

Die PCR wurde mit einer Annealing Temperatur von 55°C und den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die 5' und 3' RACE Produkte wurden in den pCR2.1 Vektor subkloniert und se-

quenziert: Die Sequenzen der subklonierten Fragmente wurden mittels der Didesoxynukleotid-Methode sequenziert (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit und ABI PRISM 310 Genetie analyser (Perkin Elmer)). T7 und M13 Vorwärts-Primer wurden für die Sequenzierung der in den pCR2.1 Vektor klonierten Produkte verwendet. Beide Stränge der Codierungsregion wurden vom Vienna VBC Genomics-Sequencing Service sequenziert, wobei infrarotmarkierte Primer (IRD700 und IRD800) und ein LI-COR Long Read IR 4200 Sequenzierer (Lincoln, NE) verwendet wurden.

Fig. 5a und 5b zeigen die gesamte cDNA, die eine Größe von 2198 bp und einen offenen Leserahmen von 1530 bp aufweist (SEQ ID No: 1). Der offene Leserahmen (Startcodon bei Basenpaaren 211-213, Stopcodon bei Basenpaar 1740-1743) codiert für ein Protein von 510 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 56.8 kDa und einem theoretischen pI-Wert von 7.51.

Fig. 6a und 6b zeigen die von der cDNA hergeleitete Aminosäuresequenz der GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase (SEQ ID No: 2). Stellen für die Asparagin gebundene Glykosylierung sind bei Asn346 und Asn429.

In Fig. 7 ist die schematische GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-cDNA (oben) und der hergeleitete Hydrophobizitätsindex des codierten Proteins (unten) dargestellt, wobei ein positiver Hydrophobizitätsindex eine erhöhte Hydrophobizität bedeutet. Dazwischen sind die Größen der beiden oben genannten PCR-Produkte in Relation zur kompletten cDNA gezeigt. Der Codierungs-Bereich ist durch den Balken dargestellt, wobei "C" für den postulierten cytoplasmatischen Bereich, T für den postulierten transmembranen Bereich und G für den postulierten Golgi-Lumen katalytischen Bereich der Transferase codiert. Die Analyse der DNA-Sequenz durch "TMpred" (von EMBnet, Schweiz) ergab eine vermutliche Transmembran-Region zwischen Asn36 und Gly54. Der C-terminale Bereich des Enzyms umfasst vermutlich die katalytische Region und sollte folglich in das Lumen des Golgi-Apparats weisen. Demnach scheint diese Transferase ein Transmembranprotein des Typs II zu sein, wie alle bisher analysierten Glycosyltranferasen, die eine Rolle in der Glycoprotein-Biosynthese spielen (Joziasse, 1992 Glycobiology 2, 271-277). Die grauen Bereiche stellen die vier tryptischen Peptide, die Sechsecke die potentiellen N-Glykosylierungs-Stellen dar. Eine via NCBI zugängliche

BLASTP Suche aller Datenbanken zeigte eine Ähnlichkeit zwischen der GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase und anderen α 1,3/4-Fucosyltransferasen, z.B. der humanen Fucosyltransferase-VI. Mit 18-21% (untersucht von SIM-LALNVIEW, Expase, Schweiz) war die Gesamtähnlichkeit jenseits jeglicher Signifikanz. Dennoch weist ein Sequenzbereich von 35 Aminosäuren (SEQ ID No: 4) eine auffallend hohe Homologie zu anderen α 1,3/4 Fucosyltransferasen auf (Fig. 8). Dieser Sequenzbereich befindet sich zwischen Glu267 und Pro301 der SEQ ID No: 2.

Beispiel 5:

Expression der rekombinanten GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase in Insektenzellen

Die codierende Region der vermutlichen GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase samt cytoplasmatischer und transmembraner Region wurde mit dem Vorwärts-Primer 5'-CGGCGGATCCGCAATTGAATGATG-3' (SEQ ID NO: 16) und Rückwärts-Primer 5'-CCGGCTGCAGTACCATTAGCGCAT-3' (SEQ ID NO: 17) mit dem Expand High Fidelity PCR System von Boehringer Mannheim amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit PstI und BamHI doppelt verdaut und in Alkalin-Phosphatase behandeltem Baculovirus Transfer-Vektor pVL1393, der zuvor mit PstI und BamHI verdaut wurde, subkloniert. Um eine homologe Rekombination zu gewährleisten, wurde der Transfervektor mit Baculo Gold viral DNA (PharMingen, San Diego, CA) in Sf9 Insektenzellen in IPL-41 Medium mit Lipofectin cotransfektiert. Nach einer Inkubation von 5 Tagen bei 27°C wurden verschiedene Volumina des Überstandes mit dem rekombinanten Virus zur Infektion der Sf21 Insektenzellen verwendet. Nach einer Inkubation von 4 Tagen bei 27°C in IPL-41 Medium mit 5% FCS wurden die Sf1 Zellen geerntet und 2x mit Phosphat gepufferter Salzlösung gewaschen. Die Zellen wurden in 25 mM Tris HCL Puffer, pH 7.4, mit 2% Triton X-100 resuspendiert und durch Sonifikation auf Eis aufgebrochen.

Beispiel 6:**Assay für die GlcNAc α 1,3 Fucosyltransferase-Aktivität**

Das Homogenat und der Zellüberstand wurden auf GlcNAc α 1,3 Fucosyltransferase getestet. Blindproben wurden mit rekombinatem Baculovirus, der für die Tabak-GlcNAc-Transferase I (Strasser et al. 1999, Glycobiology, im Druck) codiert, durchgeführt.

Fig. 9 zeigt die gemessene Enzymaktivität der rekombinanten GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase sowie der Negativkontrolle. Im besten Fall war die Enzymaktivität der cotransfektierten Zellen und deren Überstand 30x höher als die der Negativkontrollen. Diese endogene Aktivität, die in Abwesenheit der rekombinanten Transferase messbar ist, kommt im wesentlichen von der Insekten- α 1,6-Fucosyltransferase und nur zu einem geringen Prozentsatz von der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase. Demnach beträgt die Erhöhung der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, die von den rekombinanten Baculoviren stammt, weit über das 100fache.

Das Enzym zeigte eine breite Maximal-Aktivität um einen pH-Wert von 7.0, wenn die Aktivität in 2-(N-Morpholin) Ethansulfonsäure-HCl Puffer gemessen wurde. Wie in Tabelle 2 ersichtlich ist, födert der Zusatz von bivalenten Kationen, insbesondere Mn²⁺, die Aktivität der rekombinanten Transferase.

Tabelle 2

Zusatzmittel (konz. 10mM)	relative Aktivität (Akzeptor : GnGn-Peptid)
	%
kein	21
EDTA	18
MnCl ₂	100
CaCl ₂	82
MgCl ₂	52
CdCl ₂	44
CoCl ₂	35
CuCl ₂	3
NiCl ₂	24
ZnCl ₂	0.6

Tabelle 3 zeigt, dass unter den eingesetzten Akzeptoren das GnGn- Peptid die höchsten Inkorporationsraten bei Standard Versuchsbedingungen zeigt, knapp gefolgt vom GnGnF⁶ -Peptid und M5Gn-Asn. Kein Transfer konnte auf das MM-Peptid festgestellt werden, welches das reduzierende GlcNAc-Ende an der 3-gebundenen Mannose nicht aufweist. Diese Struktur scheint für die Core-Fucosyltransferase notwendig zu sein. Die rekombinante Transferase war weiters inaktiv hinsichtlich die gebräuchlichen Akzeptoren, die für die Bestimmung der Blutgruppen $\alpha 1,3/4$ -Fucosyltransferasen, die die Fucose auf GlcNAc an den nicht reduzierenden Enden von Oligosacchariden transferieren. Die scheinbaren K_m-Werte für

- 32 -

die Akzeptor-Substrate GnGn-Peptid, GnGnF⁶-Peptid, M5Gn-Asn und für das Donor Substrat GDP-Fucose wurden auf 0.19, 0.13, 0.23 bzw. 0.11 geschätzt. Die Strukturen der Moleküle sind in Fig. 10a und 10b dargestellt.

Tabelle 3

Akzeptor-Substrat	rel. Aktivität	K _m -Wert
	%	mM
GnGn-Peptid	100	0.19
GnGnF ⁶ -Peptid	87	0.13
M5Gn-Asn	71	0.23
MM-Peptid	0	
Gal β 1-4GlcNAc	0	
Gal β 1-3GlcNAc	0	
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	0	

Beispiel 7:

Massenspektrometrie des Fucosyl-Transferase Produkts

Dabsyliertes GnGn-Hexapeptid (2nmol) wurde mit dem Insektenzellen-Homogenat umfassend die rekombinante GlcNAc- α 1,3 Fucosyltransferase (0.08 mU) in Gegenwart von nicht radioaktiver GDP-L-Fucose (10 nmol), 2-(N-Morpholin)Ethansulfonsäure-HCL Puffer, Triton X-100, MnCl₂, GlcNAc und AMP inkubiert. Eine Negativkontrolle wurde mit einem Homogenat der für die Blindproben infizierten Insektenzellen durchgeführt. Die Proben wurden für 16 h bei 37°C inkubiert und mittels MALDI TOF Massenspektrometrie analysiert.

Massenspektrometrie wurde auf einem DYNAMO (Therrmo BioAnalysis, Santa Fe, NM) durchgeführt, einem MALDI-TOF MS, das zur dynamischen Extraktion fähig ist (Synonym für verspätete Extraktion). Es wurden zwei Arten von Probenmatrix-Präparationen eingesetzt: Peptide und dabsylierte Glykopeptide wurden in 5% Ameisensäure gelöst und Aliquote wurden auf das Ziel aufgetragen, Luft getrocknet und mit 1% α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure bedeckt. Pyridylaminierte Glykane, reduzierende Oligosaccharide und nicht derivatisierte Glykopeptide wurden mit Wasser verdünnt, auf das Ziel aufgetragen und Luft getrocknet. Nach Zusatz von 2% 2,5-Dihydroxybenzoësäure wurden die Proben sofort durch Anlegen eines Vakuums getrocknet.

Fig. 11 zeigt das Massenspektrum dieser Proben, wobei A die Negativkontrolle darstellt: Der Hauptpeak (S) zeigt das Dabsyl-Val-Gly-Glu-(GlcNAc₄Man₃)Asn-Arg-Thr Substrat, wobei der errechnete $[M+H]^+$ Wert 2262.3 beträgt. Dieses Substrat scheint auch als Natrium Additionsprodukt und als kleineres Ion, das durch Fragmentation der Azo-Funktion der Dabsyl-Gruppe entstanden ist, bei (S*) auf. Eine geringe Produktmenge (P, $[M+H]^+ = 2408.4$) ist auf die endogene α 1,6-Fucosyltransferase zurückzuführen. Der Peak bei $m/z = 2424.0$ zeigt die unvollständige Degalactosylierung des Substrats. Das Massenspektrum B zeigt die Probe mit rekombinanter α 1,3-Fucosyltransferase. Der Hauptpeak (P) stellt das fucosyierte Produkt dar, (P*) dessen fragmentiertes Ion.

Zusätzlich wurden Aliquote beider Proben miteinander vermischt, um ähnliche Konzentrationen von Substrat und Produkt zu erhalten (Probe A). Diese Mischung wurde mit 0.1 M Ammoniumacetat, pH 4.0, umfassend 10 μ U N-Glykosidase A (Probe B) oder mit 50 mM Tris/HCl, pH 8.5, umfassend 100 μ U (1 U hydrolysiert 1 μ mol Substrat pro min) N-Glykosidase F (Probe C) verdünnt. Nach 2 und 20h wurden kleine Aliquote dieser Mischungen entnommen und mittels MALDI-TOF MS analysiert.

In Fig. 12 sind die drei Massenspektren der Proben A, B und C dargestellt. Die unverdaute Probe A zeigt zwei Hauptpeaks: Das Substrat bei 2261.4 m/z und das fucosyierte Produkt bei 2407.7 m/z . Die mittlere Kurve zeigt das Massenspektrum der Probe B, mit N-Glycosidase A behandelt, die beide Glykopeptide hydrolysiert. Der Peak bei 963.32 stellt das deglycosyierte Produkt dar. Die untere Kurve zeigt das Massenspektrum der Probe C. Die

N-Glykosidase F ist nicht in der Lage, α 1,3 fucosyierte Substrate zu hydrolysieren, so dass das Spektrum den Peak bei 2406.7 m/z des fucosyierte Produkts aufweist, während der Peak des hydrolysierten Substrats bei 963.08 m/z aufscheint.

Beispiel 8:

HPLC Analyse des pyridylaminierten Fucosyltransferase-Produkts

Die beiden oben beschriebenen Proben (fucosyierte Produkt und Negativkontrolle) wurden mit N-Glykosidase A verdaut. Die erhaltenen Oligosaccharide wurden pyridylaminiert und mittels reverse Phase HPLC analysiert (Wilson et al. 1998 Glycobiology 8, 651-661; Kubelka et al. 1994 Arch.Biochem.Biophys.308, 148-157; Hase et al. 1984 J.Biochem. 95, 197-203).

In Fig. 13 stellt im oberen Diagramm B die Negativkontrolle dar, wobei zusätzlich zum Restsubstrat (GnGn-Peptid) α 1,6 fucosiertes Produkt zu sehen ist. A weist einen Peak bei wesentlich geringerer Retentionszeit auf, was für an den reduzierenden GlcNAc- α 1,3-gebundene Fucose spezifisch ist.

Im unteren Diagramm wurde das isolierte Transferase-Produkt vor (Kurve A) und nach Verdauung durch N-Acetyl- β -Glukosaminidase (Kurve B) mit MMF³ aus Honigbiene Phospholipase A₂ (Kurve C) verglichen.

- 35 -

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Altmann Dr., Friedrich

<120> alpha 1,3-Fucosyltransferase R36247

<130> R 36247

<140>

S141>

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2198

<212> DNA

<213> Pflanze

<400> 1

actaaactcaa acgctgcatt ttcttttcc tttcaggaa ccatccaccc ataacaacaa 60
aaaaaacaaac agcaagctgt gttttttta tcgttcttt tctttaaaca agcaccccca 120
tcatggaaatc gtgctataa cgccaaaatt ttccatttcc ctttgatTTT tagtttattt 180
tgcggaaattt gcagttgggg ggcgaatttga atgatgggtc tggtgacgaa tttcgagggc 240
tcgagaacag atggtgccc acaagacagc ttaccgttt tggctccggg aggcaacccaa 300
aagagggaaat ggagcaatct aatgcctt gttgttgc tttgtgtcat cgcggagatc 360
gcgtttctgg gtaggttggaa tatggccaaa aacgcggcca tgggttactc cctcgctgac 420
ttcttctacc gctctcgagc ggtcggtt ggtgacgatt tgggttggg tttgggtggc 480
tctgatcgga attctgaatc gtatagttgtt gaggaaatggg tggagaggaa ggatgtgtc 540
acgtattcga ggggttttc caaagagcct atttttgttt ctggagctga tcaggagtgg 600
aagtctgtttt cgggttggatg taaatttggg tttagtgggg atagaaagcc agatggcga 660
tttgggttac ctcaaccaag tggAACAGCT agcattctgc gatcaatggaa atcagcagaa 720
taactatgtt agaacaatat tgccatggca agacggaggaa gatataacat cgtaatgaca 780
accagtctat ctgcggatgtt tcctgttggaa tattttcat gggctgagta tgatatgtatg 840
gcaccagtgc agccggaaaac tgaagctgtt ctgcggatgtt ctttcatttca caatttgggt 900
gctcgaaattt tccgggttgc agcttttggag gcccggaaa aatcaaacat caaaaattgtat 960
tcttatggtg gttgtcacag gaaccgtgat ggaagagtga acaaagtggaa agccctgaaag 1020
caactacaaat ttagcttagc gtttggaaaat tcgaatgggg aagattatgt aactgaaaaaa 1080
ttcttccaaat ccctgttgc tggAACTGTC cctgtgggttgc ttgggtgtcc aaatattcag 1140
gactttgttc cttctccctgg ttcaattttca catattaaag agatagagggaa tggttggatgt 1200
gttgcaaaaga ccatgagata tctagcagaa aatccccaaag catataatca atcattgggg 1260
tggAAAGTATG AGGGTCCATC tgactcccttc aaggcccttg tggatatggc agctgtgtcat 1320
tcatcggtgcc gtctttgtcat tcacttggcc acagtggatg gagagaagggaa agaaaataat 1380
ccaaaggcotta agagacgtcc ttgcggatgtc actagaggggc cagaaaccgtt atatcatatc 1440
tatgtcagag aaagggggaaag gtttggatgtt ggttccattt acctggggatc tagcaatttta 1500
actctgaatg ctgtggggc tgctgttggtt ttggatgttca catccctgaa tcttgggtcc 1560
gtatggaaaga ctggaaaggcc tgaagttata agaggggggaa gtgtttttaaa actctacaaa 1620

- 36 -

atatacccaa ttggcttgac acagagacaa gctctttata ccttcagctt caaagggtgat 1680
 gctgatttca ggagtcaactt ggagaacaat ccttgcgc agtttgaagt cattttgtg 1740
 tagcatgcgc taaatggta ctcgtctca cctgaatttag ctgcacttag ctgagcacta 1800
 gcttagatggtagatggcagt aatatggcat ggctttattt atgcctagtt 1860
 tcttggccaa ctcattgtatg tttgtataa gacatcacac ttaatttta aacttggttc 1920
 tgttagaagtg caaatccata ttaatgtttt agttttagtg ctcttatctg atcatctaga 1980
 agtcacagtt ctgttatatt gtgagtgaaa actgaaatct aatagaagga tcagatgttt 2040
 cactcaagac acattattac ttcatgttgt tttgtatgtc tcgagctttt ttagtgtctg 2100
 gaactgtccc tgtggtttga gcacctgtta ttgcttcagt gttactgtcc agtggtttac 2160
 gtttttggacc tctaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa 2198

<210> 2

<211> 510

<212> PRT

<213> Pflanze

<400> 2

Met	Met	Gly	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	Arg	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Gly	Ala
1			5				10				15				

Gln	Gln	Asp	Ser	Leu	Pro	Val	Leu	Ala	Pro	Gly	Gly	Asn	Pro	Lys	Arg
				20			25				30				

Lys	Trp	Ser	Asn	Leu	Met	Pro	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Ala
				35			40				45				

Glu	Ile	Ala	Phe	Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Met	Ala	Lys	Asn	Ala	Ala	Met
				50			55				60				

Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Asp	Phe	Phe	Tyr	Arg	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Glu
	65				70			75			80				

Gly	Asp	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Asp	Arg	Asn	Ser	Glu
				85			90				95				

Ser	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Trp	Leu	Glu	Arg	Glu	Asp	Ala	Val	Thr	Tyr
				100			105				110				

Ser	Arg	Gly	Phe	Ser	Lys	Glu	Pro	Ile	Phe	Val	Ser	Gly	Ala	Asp	Gln
				115			120				125				

Glu	Trp	Lys	Ser	Cys	Ser	Val	Gly	Cys	Lys	Phe	Gly	Phe	Ser	Gly	Asp
				130			135			140					

Arg	Lys	Pro	Asp	Ala	Ala	Phe	Gly	Leu	Pro	Gln	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala
	145				150			155			160				

Ser	Ile	Leu	Arg	Ser	Met	Glu	Ser	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Asn	Asn
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

- 37 -

165 170 175

Ile Ala Met Ala Arg Arg Gly Tyr Asn Ile Val Met Thr Thr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Asp Val Pro Val Gly Tyr Phe Ser Trp Ala Glu Tyr Asp
195 200 205

Met Met Ala Pro Val Gln Pro Lys Thr Glu Ala Ala Leu Ala Ala Ala
210 215 220

Phe Ile Ser Asn Cys Gly Ala Arg Asn Phe Arg Leu Gln Ala Leu Glu
225 230 235 240

Ala Leu Glu Lys Ser Asn Ile Lys Ile Asp Ser Tyr Gly Gly Cys His
245 250 255

Arg Asn Arg Asp Gly Arg Val Asn Lys Val Glu Ala Leu Lys His Tyr
260 265 270

Lys Phe Ser Leu Ala Phe Glu Asn Ser Asn Glu Glu Asp Tyr Val Thr
275 280 285

Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly Thr Val Pro Val Val Val
290 295 300

Gly Ala Pro Asn Ile Gln Asp Phe Ala Pro Ser Pro Gly Ser Ile Leu
305 310 315 320

His Ile Lys Glu Ile Glu Asp Val Glu Ser Val Ala Lys Thr Met Arg
325 330 335

Tyr Leu Ala Glu Asn Pro Glu Ala Tyr Asn Gln Ser Leu Arg Trp Lys
340 345 350

Tyr Glu Gly Pro Ser Asp Ser Phe Lys Ala Leu Val Asp Met Ala Ala
355 360 365

Val His Ser Ser Cys Arg Leu Cys Ile His Leu Ala Thr Val Ser Arg
370 375 380

Glu Lys Glu Glu Asn Asn Pro Ser Leu Lys Arg Arg Pro Cys Lys Cys
385 390 395 400

Thr Arg Gly Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg Glu Arg Gly
405 410 415

Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu Arg Ser Ser Asn Leu Thr Leu

- 38 -

420 425 430

Asn Ala Val Lys Ala Ala Val Val Leu Lys Phe Thr Ser Leu Asn Leu
435 440 445

—
Val Pro Val Trp Lys Thr Glu Arg Pro Glu Val Ile Arg Gly Gly Ser
450 455 460

Ala Leu Lys Leu Tyr Lys Ile Tyr Pro Ile Gly Leu Thr Gln Arg Gln
465 470 475 480

Ala Leu Tyr Thr Phe Ser Phe Lys Gly Asp Ala Asp Phe Arg Ser His
485 490 495

Leu Glu Asn Asn Pro Cys Ala Lys Phe Glu Val Ile Phe Val
500 505 510

<210> 3

<211> 105

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:cDNA

<400> 3

gaagccctga agcactacaa attttagctta gcgttgaaa attcgaatga ggaagattat 60
gtaactgaaa aattcttcca atcccttgtt gctgaaactg tccct 105

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

<400> 4

Glu Ala Leu Lys His Tyr Lys Phe Ser Leu Ala Phe Glu Asn Ser Asn

1 5 10 15

Glu Glu Asp Tyr Val Thr Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly
20 25 30

Thr Val Pro

35

- 39 -

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

<400> 5

Lys Pro Asp Ala Xaa Phe Gly Leu Pro Gln Pro Ser Thr Ala Ser

1

5

10

15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

<400> 6

Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg

1

5

10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

<400> 7

Met Glu Ser Ala Glu Tyr Tyr Ala Glu Asn Asn Ile Ala

1

5

10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Peptid

- 40 -

<400> 8

Gly Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu

1 5 10

—
<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 9

gcngartayt aygcngaraa yaayathgc

29

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 10

crtadatrtg rtanacngty tc

22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 11

tadatnswyt ccatytcraa

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 12

ctggaaactgt ccctgtggtt

20

- 41 -

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 13

agtgcactag agggccagaa

20

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 14

ttcgagcacc acaattggaa at

22

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 15

gaatgcaaag acggcacgtt gaat

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 16

cggcggttcc gcaattgaat gatg

24

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

- 42 -

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA

<400> 17

ccggctgcag taccat~~t~~tag cgcat

25

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO: 1 mit einem offenen Leserahmen von Basenpaar 211 bis Basenpaar 1740 umfasst oder zumindest 50% Homologie zur obengenannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder eine Sequenz umfasst, die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist, wobei die Sequenz für ein pflanzliches Protein mit einer Fucosyltransferase-Aktivität codiert oder dazu komplementär ist.
2. DNA-Molekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es für ein Protein mit einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, insbesondere mit einer Core- α 1,3-Fucosyltransferase-Aktivität, codiert.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es zumindest 70-80%, besonders bevorzugt zumindest 95%, Homologie zur Sequenz gemäß der Sequenz-Identifikationsnummer 1 aufweist.
4. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es 2150 bis 2250, insbesondere 2198, Basenpaare umfasst.
5. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO: 3 umfasst oder eine Sequenz umfasst, die zumindest 85%, insbesondere zumindest 95%, Homologie zur obengenannten Sequenz aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit der oben genannten Sequenz hybridisiert oder die infolge des genetischen Codes zur oben genannten DNA-Sequenz degeneriert ist.
6. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Teilsequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 umfasst und eine Größe von 20 bis 200, vorzugsweise 30 bis 50, Basenpaaren aufweist.

7. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es kovalent mit einer nachweisbaren Markierungssubstanz assoziiert ist.
8. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder Teile unterschiedlicher Länge davon, mit mindestens 20 Basenpaaren umfasst.
9. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder Teile unterschiedlicher Länge davon in inverser Orientierung zum Promotor umfasst.
10. DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA-Sequenz eine Deletions-, Insertions- und/oder Substitutionsmutation umfasst.
11. DNA-Molekül, das für ein Ribozym codiert, dadurch gekennzeichnet, dass es zwei Sequenzabschnitte von jeweils mindestens 10 bis 15 Basenpaaren aufweist, die Sequenzabschnitten eines DNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 komplementär sind, so dass das Ribozym die mRNA komplexiert und schneidet, die von einem natürlichen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase DNA-Molekül transkribiert wird.
12. Biologisch funktioneller Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 10 oder 11 umfasst.
13. Verfahren zur Herstellung einer cDNA umfassend ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass RNA aus Insekten- bzw. pflanzlichen Zellen, insbesondere aus Hypokotylzellen, isoliert wird, mit der nach Zusetzen einer reversen Transkriptase und Primern eine reverse Transkription durchgeführt wird.
14. Verfahren zum Klonieren einer GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, dadurch gekennzeichnet, dass ein DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in einen Vektor kloniert wird, der an-

schließend in eine Wirtszelle bzw. einen Wirt transfektiert wird, wobei durch Selektion und Amplifikation von transfektierten Wirtszellen Zelllinien erhalten werden, die die aktive GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase exprimieren.

15. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, bzw. Pflanzen oder Insekten mit einer unterdrückten bzw. vollständig unterbundenen GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest einer der Vektoren gemäß Anspruch 8, 9 oder 12 in die Wirtszelle bzw. Pflanze oder in das Insekt eingeschleust wird.

16. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Wirtszellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen bzw. Pflanzen oder Insekten, dadurch gekennzeichnet, dass das DNA-Molekül gemäß Anspruch 10 in das Genom der Wirtszelle bzw. Pflanze oder des Insekts an der Stelle der nichtmutierten, homologen Sequenz eingeschleust wird.

17. Rekombinante Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren gemäß Anspruch 15 oder 16 hergestellt sind und dass ihre GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.

18. Rekombinante Insekten bzw. Insektenzellen, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren gemäß Anspruch 15 oder 16 hergestellt sind und dass ihre GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferaseproduktion unterdrückt bzw. vollständig unterbunden ist.

19. PNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Basensequenz umfasst, die komplementär zur Sequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Teilsequenzen davon ist.

20. PNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Basensequenz umfasst, die der Sequenz eines DNA-Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie Teilsequenzen davon entspricht.

21. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, insbesondere Pflanzen- oder Insektenzellen, die eine blockierte Expression der GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase auf dem Niveau der Transkription bzw. Translation aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass PNA-Moleküle gemäß Anspruch 19 oder 20 in die Zellen eingeschleust werden.
22. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 17 oder 18 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 21 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.
23. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 17 oder 18 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 21 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.
24. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten humanen Glykoproteinen zur medizinischen Verwendung, dadurch gekennzeichnet, dass das System nach Anspruch 17 oder 18 oder Pflanzen oder Insekten bzw. Zellen, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 21 hergestellt sind, mit dem Gen, das für das Glykoprotein codiert, transfektiert ist (sind), so dass die rekombinanten Glykoproteine exprimiert werden.
25. Rekombinante Glykoproteine, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 22 in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass ihre Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.
26. Rekombinante humane Glykoproteine, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 23 in pflanzlichen

oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass ihre Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.

27. Rekombinante humane Glykoproteine zur medizinischen Verwendung, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 24 in pflanzlichen oder Insekten-Systemen hergestellt wurden und dass ihre Peptidsequenz unter 50%, insbesondere unter 20%, besonders bevorzugt 0%, der in nicht Fucosyltransferase reduzierten pflanzlichen oder Insekten-Systemen exprimierten Proteinen vorkommenden α 1,3-gebundenen Fucose-Reste aufweist.

28. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie rekombinante Glykoproteine nach einem der Ansprüche 25 bis 27 umfasst.

29. Verfahren zum Selektieren von DNA-Molekülen, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass DNA-Moleküle gemäß Anspruch 7 zur Probe zugesetzt werden, die an die DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, binden.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe genomische DNA eines pflanzlichen bzw. Insekten-Organismus umfasst.

31. DNA-Moleküle, die für eine GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase codieren, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 29 oder 30 selektiert und anschließend aus der Probe isoliert wurden.

32. Präparation von GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase, die nach einem Verfahren gemäß Anspruch 14 kloniert wurde, dadurch gekennzeichnet, dass sie Isoformen mit pI-Werten zwischen 6.0 und 9.0, insbesondere zwischen 6.8 und 8.2, aufweist.

33. Präparation nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass

sie Isoformen mit pI-Werten von 6.8, 7.1 und 7.6 aufweist.

34. Verfahren zur Herstellung von verpflanzlichen Kohlenhydrat-Einheiten von menschlichen und anderen Wirbeltier-Glykoproteinen, dadurch gekennzeichnet, dass zu einer Probe, die eine Kohlenhydrat-Einheit bzw. ein Glykoprotein umfasst, Fucose-Einheiten sowie von einem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 codierte GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase zugesetzt werden, so dass Fucose in α 1,3-Stellung durch die GlcNAc- α 1,3-Fucosyltransferase an die Kohlenhydrat-Einheit bzw. das Glykoprotein gebunden wird.

1/16

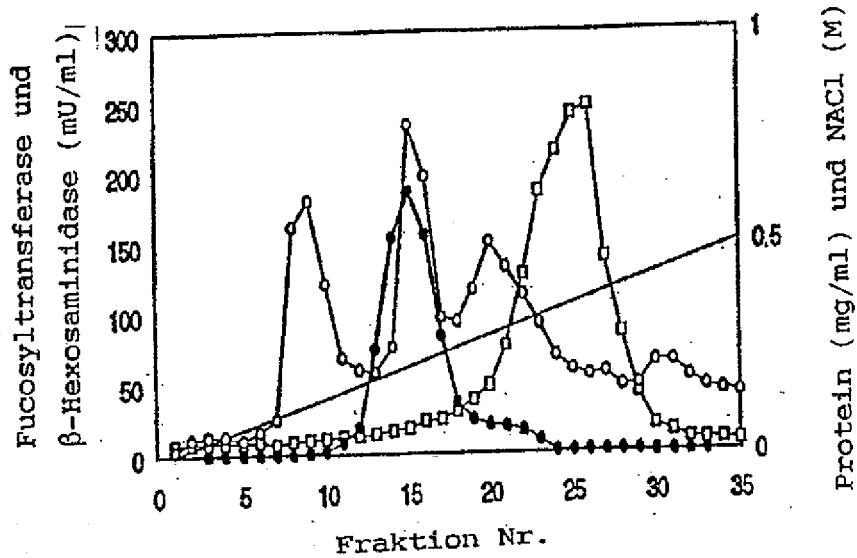


FIG.1 a

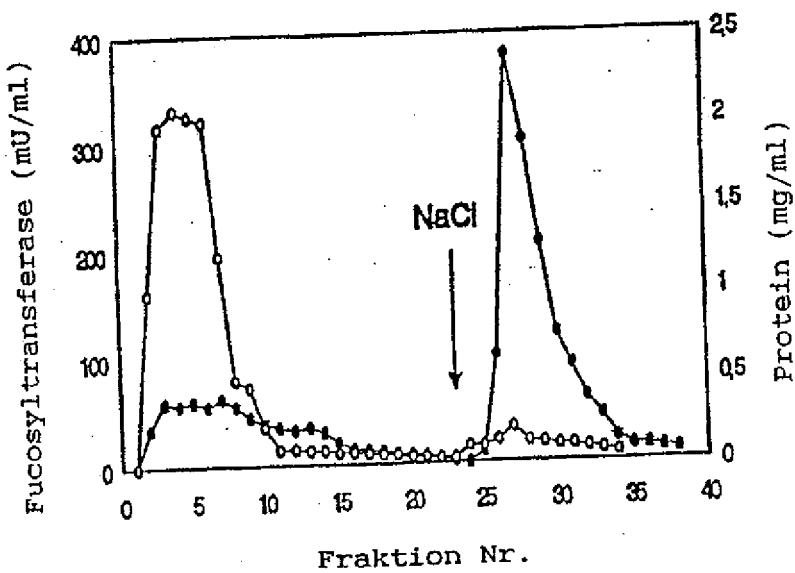


FIG.1 b

2/16

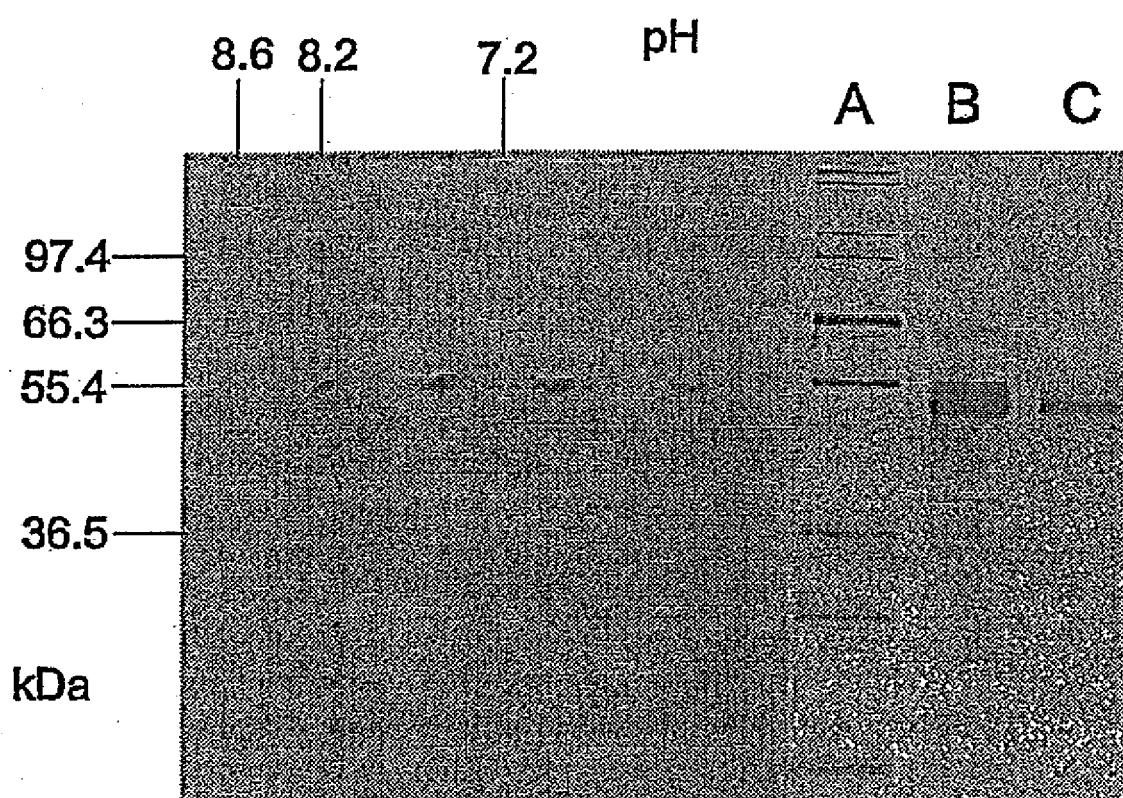
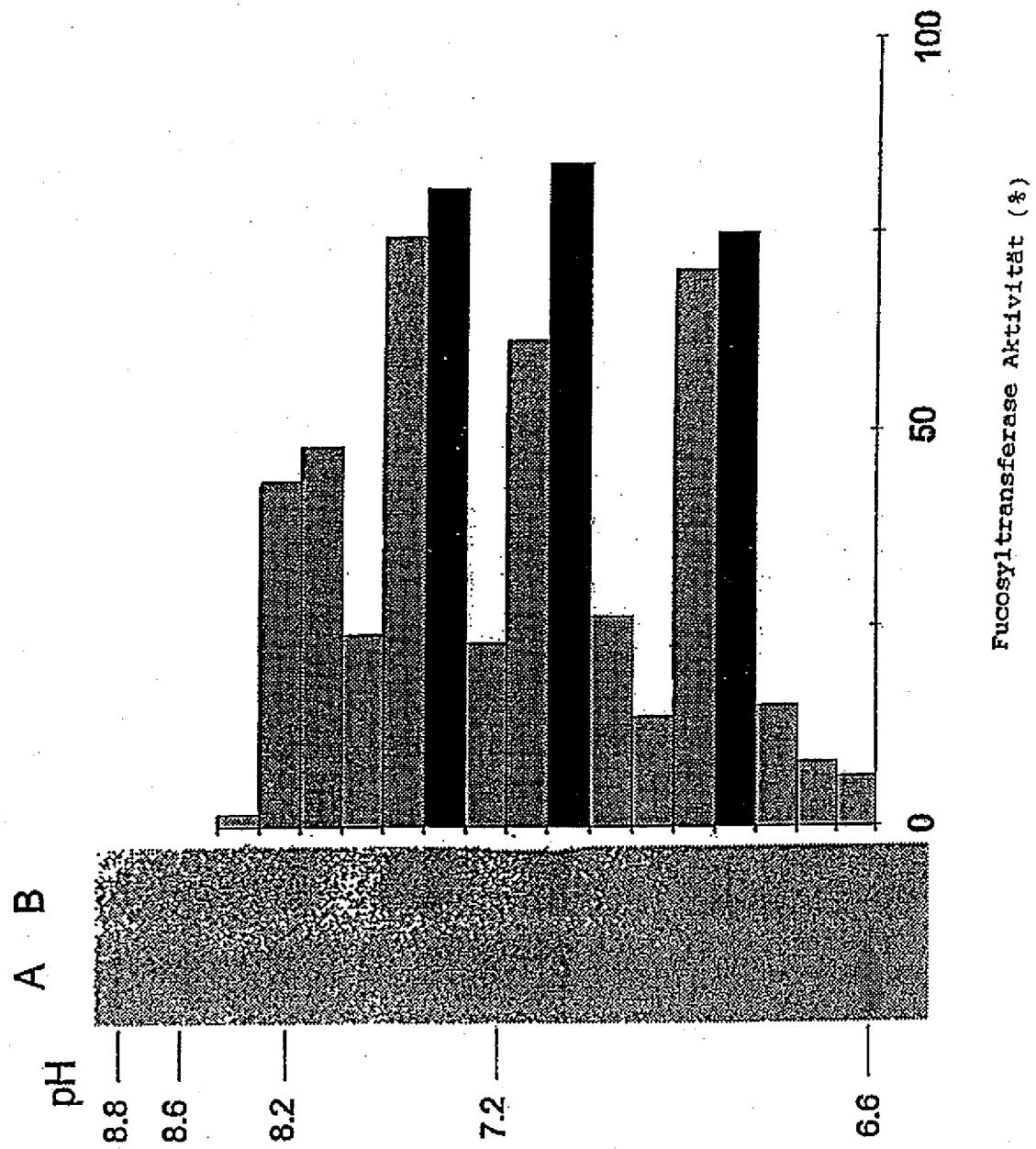


FIG.2

3/16

FIG.3



4/16

- 1 KPDAxFGLPQPSTAS
- 2 PETVYHIYVR
- 3 MESAЕYYAENNIA
- 4 GRFEMESIYL

S1 5'- GCIGAATACTACGCIGAAAACAACATCGC -3'
 G T T G T T T

A2 5'- CATA^AGATATGATAIA^ACIGTCTC -3'
 G T G G T

A3 5'- TAGATICACTCCATCTCAAA -3'
 T GTT T G

FIG.4

5/16

ACTAACTCAA ACGCTGCATT TTCTTTTTC TTTCAGGGAA CCATCCACCC ATAACAACAA	60
AAAAAAACAAC AGCAAGCTGT GTTTTTTTA TCGTTCTTT TCTTTAAACA AGCACCCCCA	120
TCATGGAATC GTGCTCATAA CGCCAAAATT TTCCATTCC CTTTGATTT TAGTTATTT	180
TGCGGAATTG GCAGTTGGGG GCGCAATTGA ATGATGGGTC TGTTGACGAA TCTTCGAGGC	240
TCGAGAACAG ATGGTGCCCA ACAAGACAGC TTACCCGTTT TGGCTCCGGG AGGCAACCCA	300
AAGAGGAAAT GGAGCAATCT AATGCCTCTT GTTGTGCCC TTGTGGTCAT CGCGGAGATC	360
GCCTTCTGG GTAGGTTGGA TATGCCAAA AACGCCGCCA TGGTTGACTC CCTCGCTGAC	420
TTCTTCTACC GCTCTCGAGC GGTCGTTGAA GGTGACGATT TGGGGTTGGG TTTGGTGGCT	480
TCTGATCGGA ATTCTGAATC GTATAGTTGT GAGGAATGGT TGGAGAGGGG GGATGCTGTC	540
ACGTATTGCA GGGGCTTTTC CAAAGAGCCT ATTTTGTTT CTGGAGCTGA TCAGGAGTGG	600
AAGTCGTGTT CGGTTGGATG TAAATTGGG TTAGTGGGG ATAGAAAGCC AGATGCCGCA	660
TTTGGGTTAC CTCAACCAAG TGGAACAGCT AGCATTCTGC GATCAATGGA ATCAGCAGAA	720
TACTATGCTG AGAACAAATAT TGCCATGGCA AGACGGAGGG GATATAACAT CGTAATGACA	780
ACCAGTCTAT CTTCGGATGT TCCTGTTGGA TATTTTCAT GGGCTGAGTA TGATATGATG	840
GCACCACTGTC AGCCGAAAC TGAAGCTGCT CTTGGAGCTG CTTTCATTTC CAATTGTGGT	900
GCTCGAAATT TCCGGTTGCA AGCTCTTGAG GCCCTTGAAA AATCAAACAT CAAAATTGAT	960
TCTTATGGTG GTTGTACAG GAACCGTGAT GGAAGAGTGAA ACAGGTGGA AGCCCTGAAG	1020
CACTACAAAT TTAGCTTAGC GTTTGAAAAT TCGAATGAGG AAGATTATGT AACTGAAAAA	1080
TTCTTCCAAT CCCTTGTGTC TGGAACTGTC CCTGTGGTTG TTGGTGCTCC AAATATTCA	1140

FIG.5 a

6/16

GACTTTGCTC CTTCTCCTGG TTCAATTAA CATATTAAAG AGATAGAGGA TGTTGAGTCT	1200
GTTGCAAAGA CCATGAGATA TCTAGCAGAA AATCCCGAAG CATATAATCA ATCATTGAGG	1260
TGGAAGTATG AGGGTCCATC TGACTCCTTC AAGGCCCTTG TGGATATGGC AGCTGTGCAT	1320
TCATCGTGCC GTCTTIGCAT TCACTTGGCC ACAGTGAGTA GAGAGAAGGA AGAAAATAAT	1380
CCAAGCCTTA AGAGACGTCC TTGCAAGTGC ACTAGAGGGC CAGAAACCGT ATATCATATC	1440
TATGTCAGAG AAAGGGGAAG GTTTGAGATG GAGTCCATT ACCTGAGGTC TAGCAATTAA	1500
ACTCTGAATG CTGTGAAGGC TGCTGTTGTT TTGAAGTTCA CATCCCTGAA TCTTGTGCCT	1560
GTATGGAAGA CTGAAAGGCC TGAAGTTATA AGAGGGGGGA GTGCTTTAAA ACTCTACAAA	1620
ATATAACCAA TTGGCTTGAC ACAGAGACAA GCTCTTTATA CCTTCAGCTT CAAAGGTGAT	1680
GCTGATTCA GGAGTCACTT GGAGAACAAAT CCTTGTGCCA AGTTTGAAGT CATTGGTGTG	1740
TAGCATGCGC TAAATGGTAC CTCTGCTCTA CCTGAATTAG CTTCACTTAG CTGAGCACTA	1800
GCTAGAGTTT TAGGAATGAG TATGGCAGTG AATATGGCAT GGCTTATTT ATGCCTAGTT	1860
TCTTGGCCAA CTCATTGATG TTTGTATAA GACATCACAC TTTAATTAA AACTTGTTC	1920
TGTAGAAGTG CAAATCCATA TTTAATGCTT AGTTTAGTG CTCTTATCTG ATCATCTAGA	1980
AGTCACAGTT CTTGTATATT GTGAGTGAAA ACTGAAATCT AATAGAAGGA TCAGATGTTT	2040
CACTCAAGAC ACATTATTAC TTCATGTTGT TTTGATGATC TCGAGCTTT TTAGTGTCTG	2100
GAACGTCCC TGTGGTTGA GCACCTGTTA TTGCTTCAGT GTTACTGTCC AGTGGTTATC	2160
GTTTTGACC TCTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAA	2198

FIG.5 b

7/16

Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Arg Gly Ser Arg Thr Asp Gly Ala
 1 5 10 15

Gln Gln Asp Ser Leu Pro Val Leu Ala Pro Gly Gly Asn Pro Lys Arg
 20 25 30

Lys Trp Ser Asn Leu Met Pro Leu Val Val Ala Leu Val Val Ile Ala
 35 40 45

Glu Ile Ala Phe Leu Gly Arg Leu Asp Met Ala Lys Asn Ala Ala Met
 50 55 60

Val Asp Ser Leu Ala Asp Phe Phe Tyr Arg Ser Arg Ala Val Val Glu
 65 70 75 80

Gly Asp Asp Leu Gly Leu Gly Leu Val Ala Ser Asp Arg Asn Ser Glu
 85 90 95

Ser Tyr Ser Cys Glu Glu Trp Leu Glu Arg Glu Asp Ala Val Thr Tyr
 100 105 110

Ser Arg Gly Phe Ser Lys Glu Pro Ile Phe Val Ser Gly Ala Asp Gln
 115 120 125

Glu Trp Lys Ser Cys Ser Val Gly Cys Lys Phe Gly Phe Ser Gly Asp
 130 135 140

Arg Lys Pro Asp Ala Ala Phe Gly Leu Pro Gln Pro Ser Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ser Ile Leu Arg Ser Met Glu Ser Ala Glu Tyr Tyr Ala Glu Asn Asn
 165 170 175

Ile Ala Met Ala Arg Arg Arg Gly Tyr Asn Ile Val Met Thr Thr Ser
 180 185 190

Leu Ser Ser Asp Val Pro Val Gly Tyr Phe Ser Trp Ala Glu Tyr Asp
 195 200 205

Met Met Ala Pro Val Gln Pro Lys Thr Glu Ala Ala Leu Ala Ala Ala
 210 215 220

Phe Ile Ser Asn Cys Gly Ala Arg Asn Phe Arg Leu Gln Ala Leu Glu
 225 230 235 240

Ala Leu Glu Lys Ser Asn Ile Lys Ile Asp Ser Tyr Gly Gly Cys His

FIG.6 a

8/16

Arg Asn Arg Asp Gly Arg Val Asn Lys Val Glu Ala Leu Lys His Tyr
260 265 270

Lys Phe Ser Leu Ala Phe Glu Asn Ser Asn Glu Glu Asp Tyr Val Thr
275 280 285

Glu Lys Phe Phe Gln Ser Leu Val Ala Gly Thr Val Pro Val Val Val
290 295 300

Gly Ala Pro Asn Ile Gln Asp Phe Ala Pro Ser Pro Gly Ser Ile Leu
305 310 315 320

His Ile Lys Glu Ile Glu Asp Val Glu Ser Val Ala Lys Thr Met Arg
325 330 335

Tyr Leu Ala Glu Asn Pro Glu Ala Tyr Asn Ser Leu Arg Trp Lys
340 345 350

Tyr Glu Gly Pro Ser Asp Ser Phe Lys Ala Leu Val Asp Met Ala Ala
355 360 365

Val His Ser Ser Cys Arg Leu Cys Ile His Leu Ala Thr Val Ser Arg.
370 375 380

Glu Lys Glu Glu Asn Asn Pro Ser Leu Lys Arg Arg Pro Cys Lys Cys
385 390 395 400

Thr Arg Gly Pro Glu Thr Val Tyr His Ile Tyr Val Arg Glu Arg Gly
405 410 415

Arg Phe Glu Met Glu Ser Ile Tyr Leu Arg Ser Ser Asn Leu Thr Leu
420 425 430

Asn Ala Val Lys Ala Ala Val Val Leu Lys Phe Thr Ser Leu Asn Leu
435 440 445

Val Pro Val Trp Lys Thr Glu Arg Pro Glu Val Ile Arg Gly Gly Ser
450 455 460

Ala Leu Lys Leu Tyr Lys Ile Tyr Pro Ile Gly Leu Thr Gln Arg Gln
465 470 475 480

Ala Leu Tyr Thr Phe Ser Phe Lys Gly Asp Ala Asp Phe Arg Ser His
485 490 495

Leu Glu Asn Asn Pro Cys Ala Lys Phe Glu Val Ile Phe Val
500 505 510

FIG.6 b

9/16

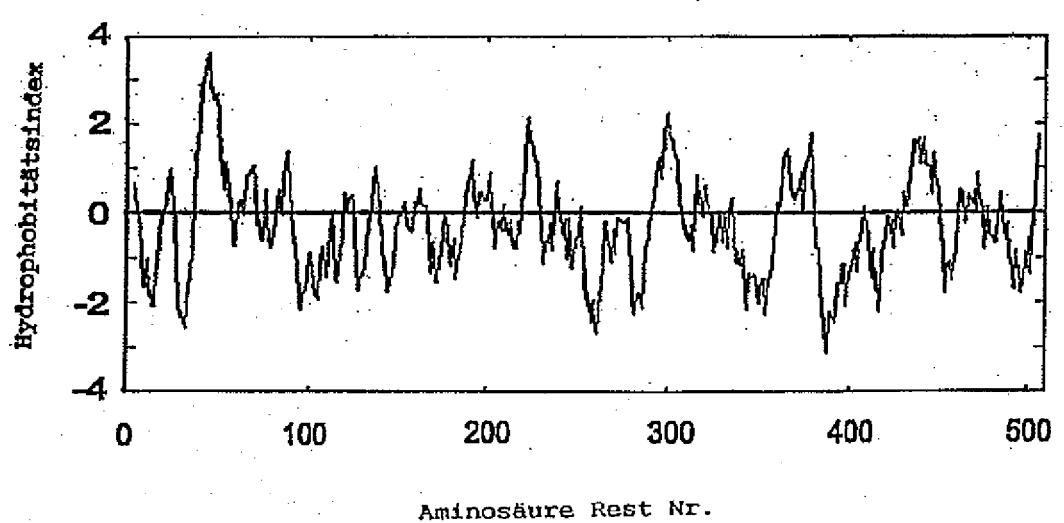
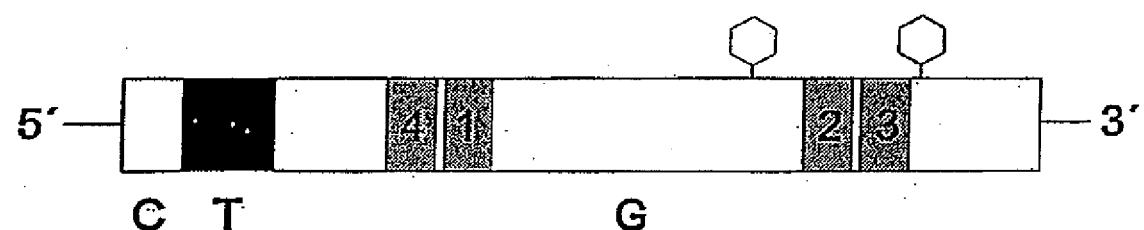


FIG.7

10/16

Transferase	Art	#	Konserviertes Motiv
FucT-III	Mungo Bohne	P21217	267 -EALKHYKFSLAFENSNEEDYVTERKFQ-SLVAGTVE
FucT-III	Mensch	O19058	236 -ETLSRYKTYLAEFENSLHPDYITTEKLWRNALEAWAVE
FucT-III	Schimpanse	Q11128	247 -ETLSRYKTYLAEFENSLHPDYITTEKLWRNALEAWAVP
FucT-V	Mensch	P56433	249 -ETLSRYKTYLAEFENSLHPDYITTEKLWRNALEAWAVP
FucT-V	Schimpanse	P51993	249 -ETLSRYKTYLAEFENSLHPDYITTEKLWRNALEAWAVP
FucT-VI	Mensch	P56434	235 -ETLSRYKTYLAEFENSLHPDYITTEKLWRNALEAWAVP
FucT-VI	Schimpanse	Q11126	235 -ETLSRYKTYLAEFENSQHDSQYKTYLAEFENSQHDSQY
FucT-III	Rind	Q11126	240 -KQLSQXKTYLAEFENSLHPDYITTEKLWRNALEAWAVP
FucT-?	chin. Hamster	O35886	237 -GTLARYKTYLAEFENSLHPDYITTEKLWNALEAWAVP
FucT-VII	Mensch	Q11130	217 -PTVAQTRFYLSEENSQHRSQHDSQYKTYLAEFENSQHDSQY
FucT-VII	Maus	Q11131	264 -PTLARYRFTYLYLAEFENSQHRSQHDSQYKTYLAEFENSQHDSQY
FucT-VII	<i>Schistosoma mansoni</i>	076204	226 -PTLARYRFTYLYLAEFENSQHRSQHDSQYKTYLAEFENSQHDSQY
FucT-IV	Mensch	P22083	277 -HTVARYKTYLAEFENSQHDSQYKTYLAEFENSQHDSQY
FucT-IV	Maus	Q11127	305 -HTVARYKTYLAEFENSQHDSQYKTYLAEFENSQHDSQY
FucT-IV	Ratte	Q62994	305 -HTVARYKTYLAEFENSQHDSQYKTYLAEFENSQHDSQY
FucT-IV	Huhn	Q98952	228 -RTVSAYKTYLAEFENSQHDSQYKTYLAEFENSQHDSQY
FucT-IX	Maus	088819	233 -PTLISTCKFYI.SEEENSILSEENSLCCEENSQGYGXVTERK
FucA	<i>Dicyostelium discoidinum</i>	076544	247 -DVLKRYNTALATENSLICKDYYTERKLYNAFL-AGSVP
lpFructI	<i>Helicobacter pylori</i>	032631	106 -ETLSQXKTNLCEENSQGYGXVTERKILD-AFYSHTIP
lpFructI2	<i>Helicobacter pylori</i>	030511	227 -ETLSQXKTNLCEENTQGYGXVTERKILD-AFYSHTIP
CEFT-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q21362	303 -MLDTDYHYYTVEENSICEDYVTERKWSGYQNTTIP

* Zugriffsnummer für die SwissProt Protein Sequenz Datenbank

୬୩

11/16

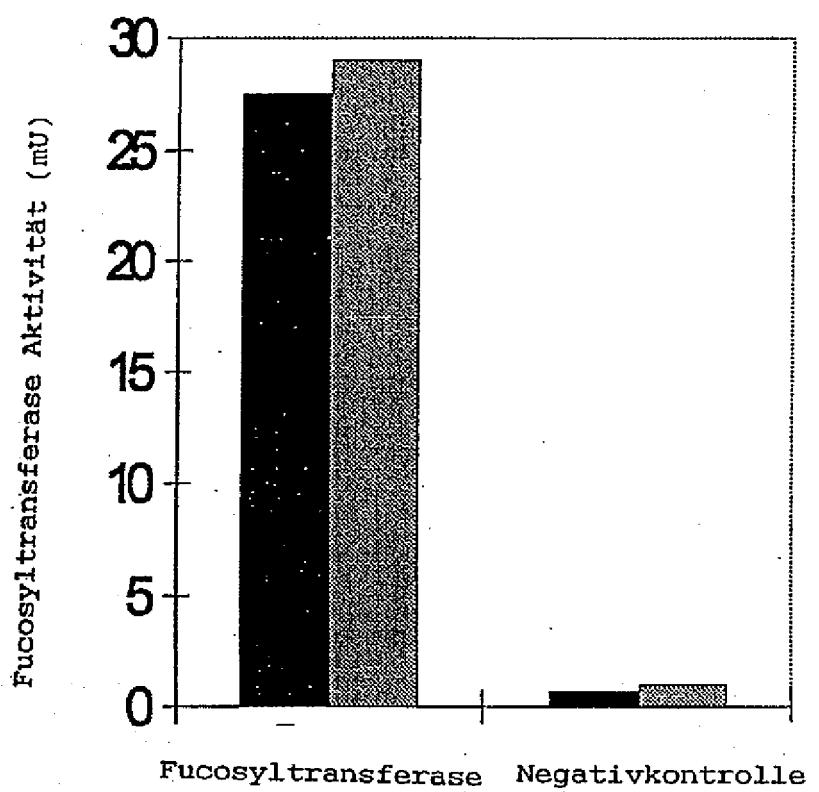


FIG.9

12/16

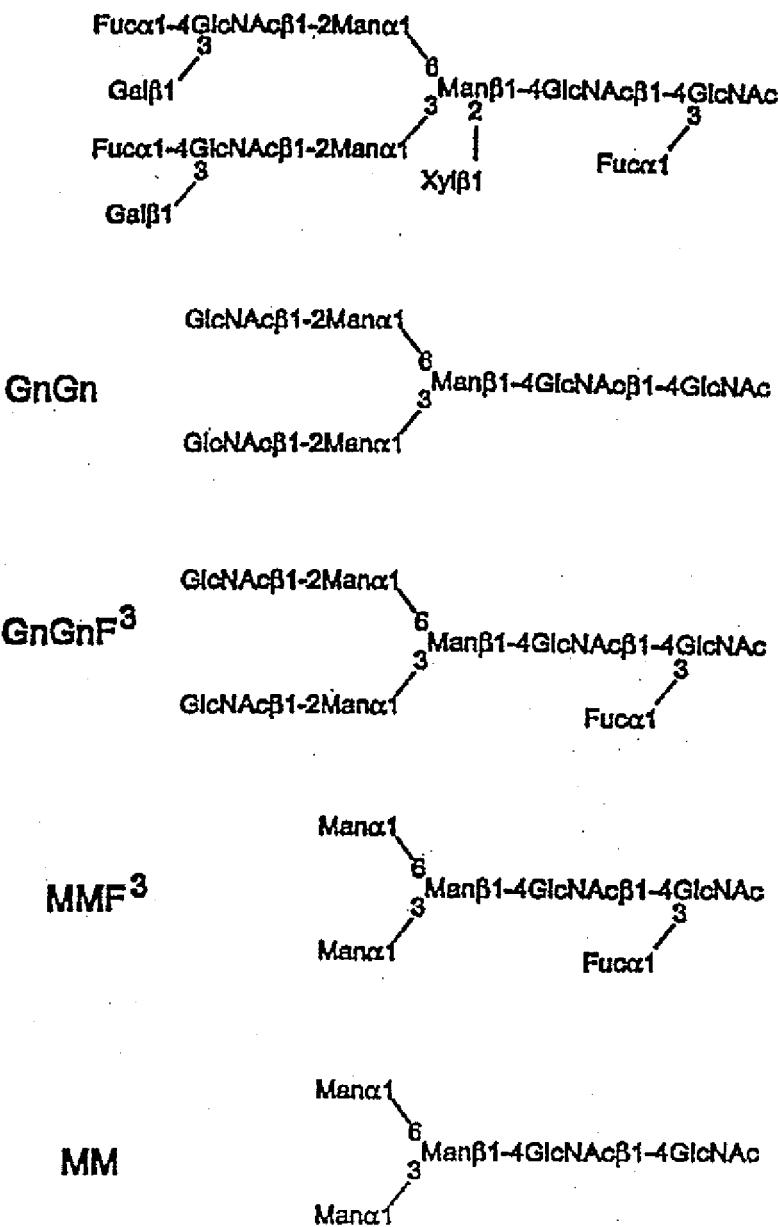


FIG.10 a

13/16

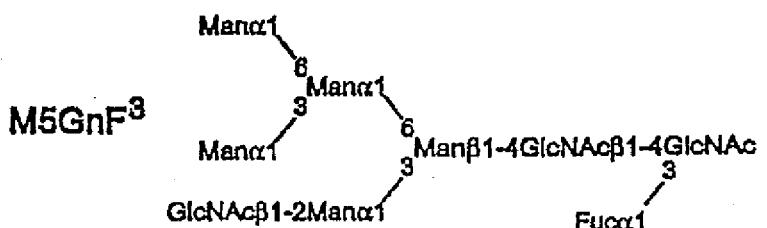
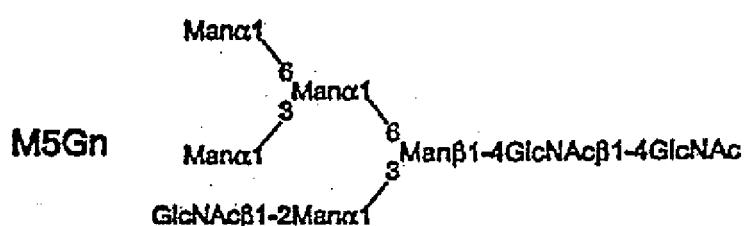
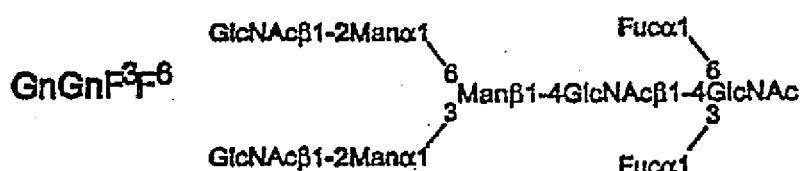
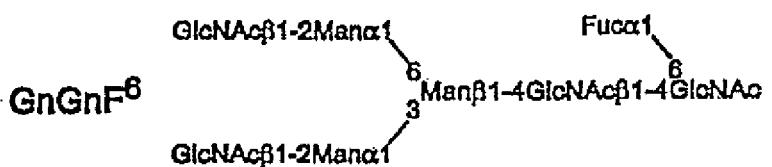
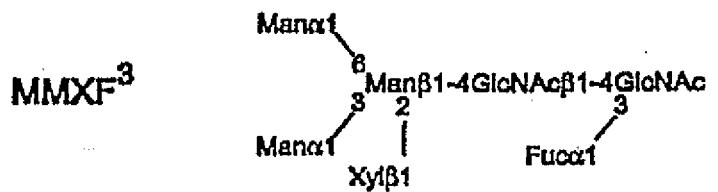


FIG. 10 b

14/16

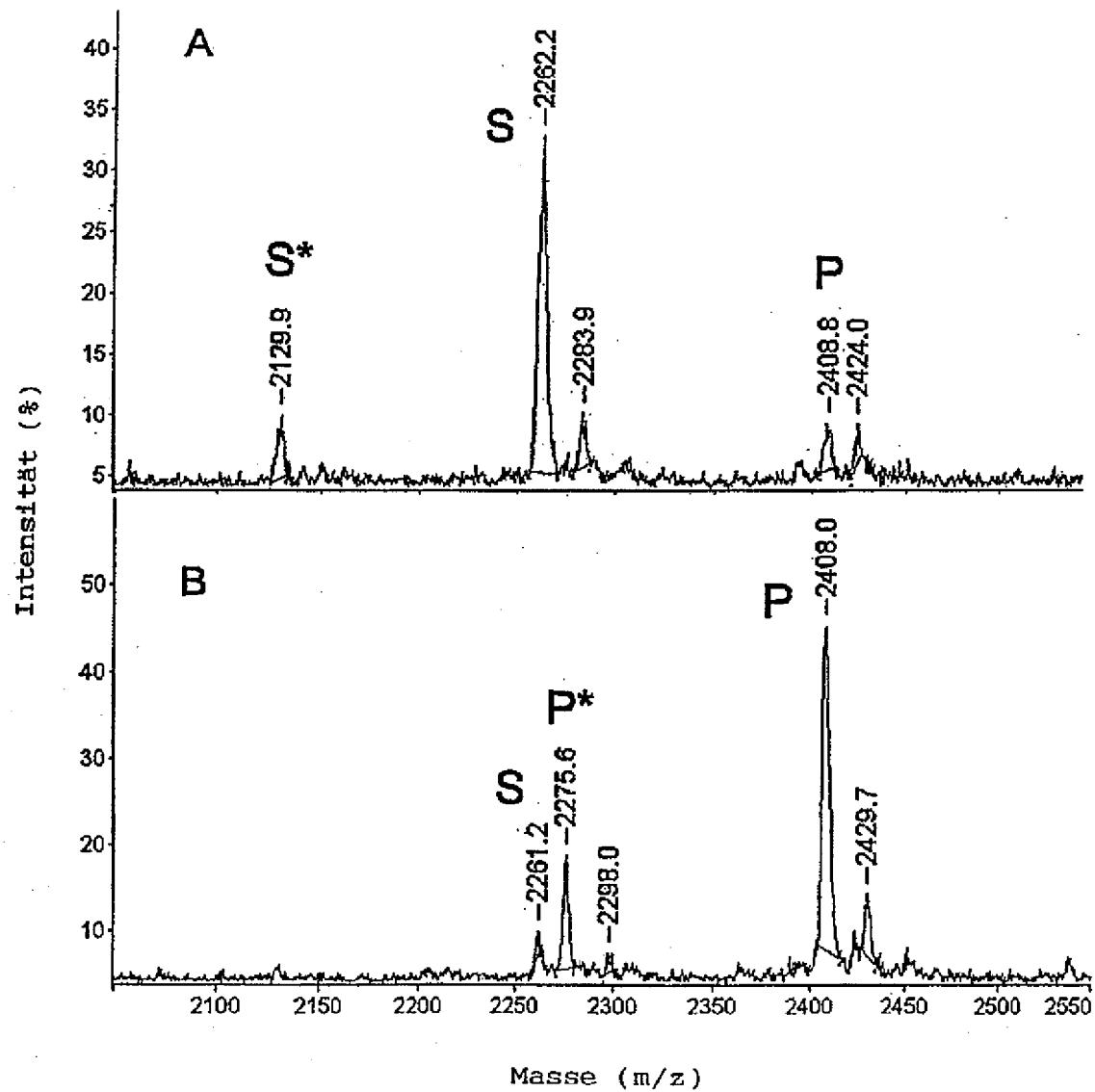
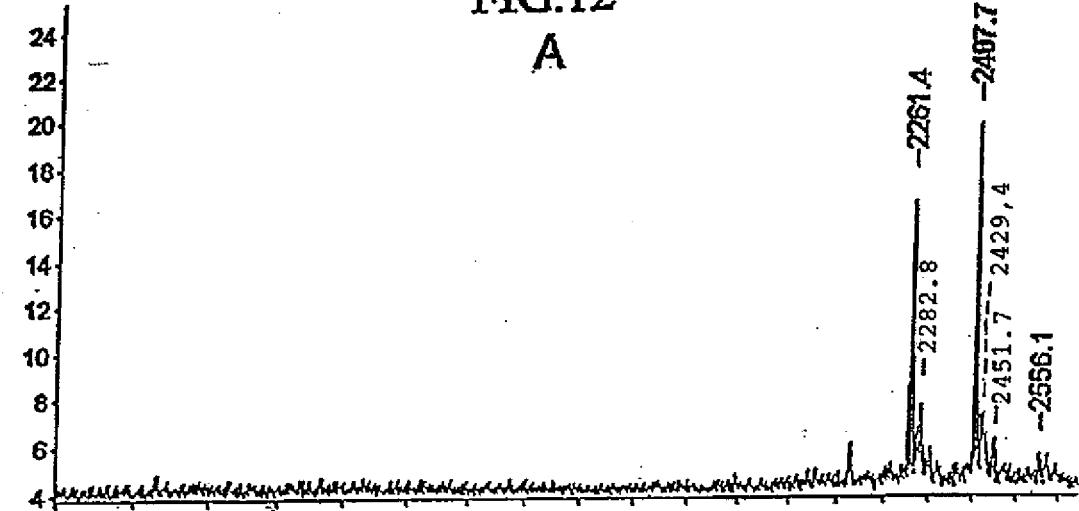


FIG.11

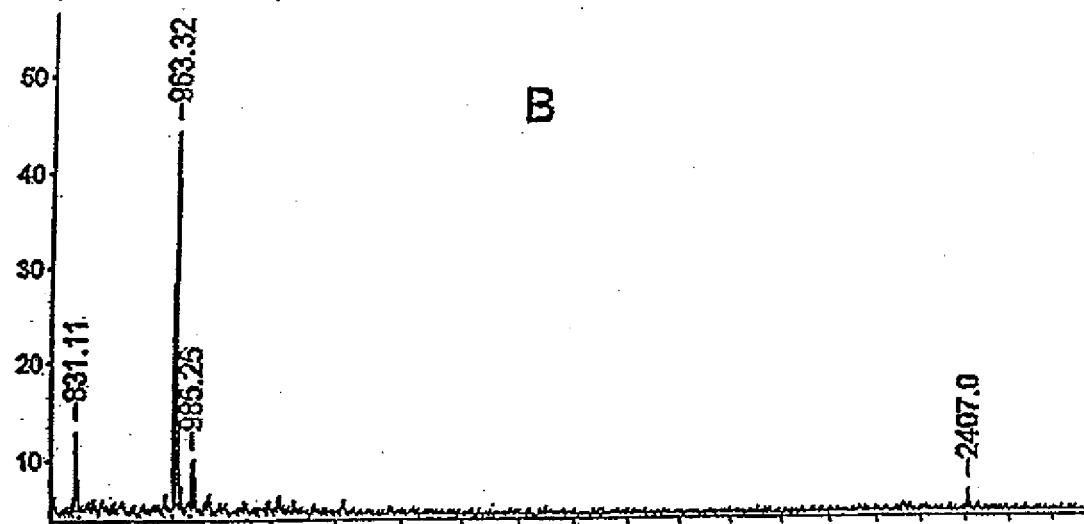
15/16

FIG.12

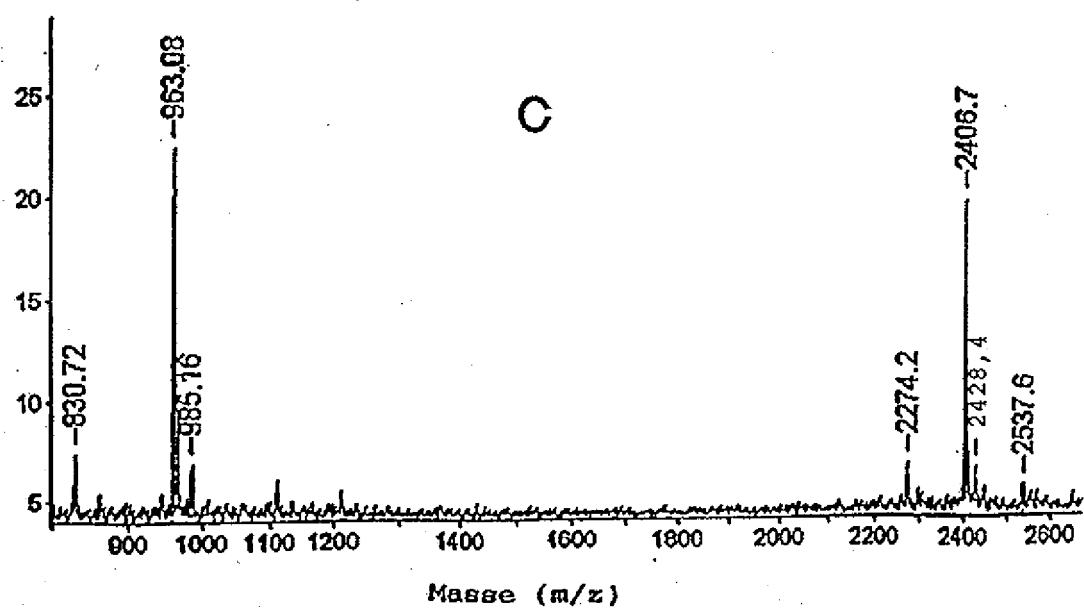
A



B



C

Masse (m/z)

16/16

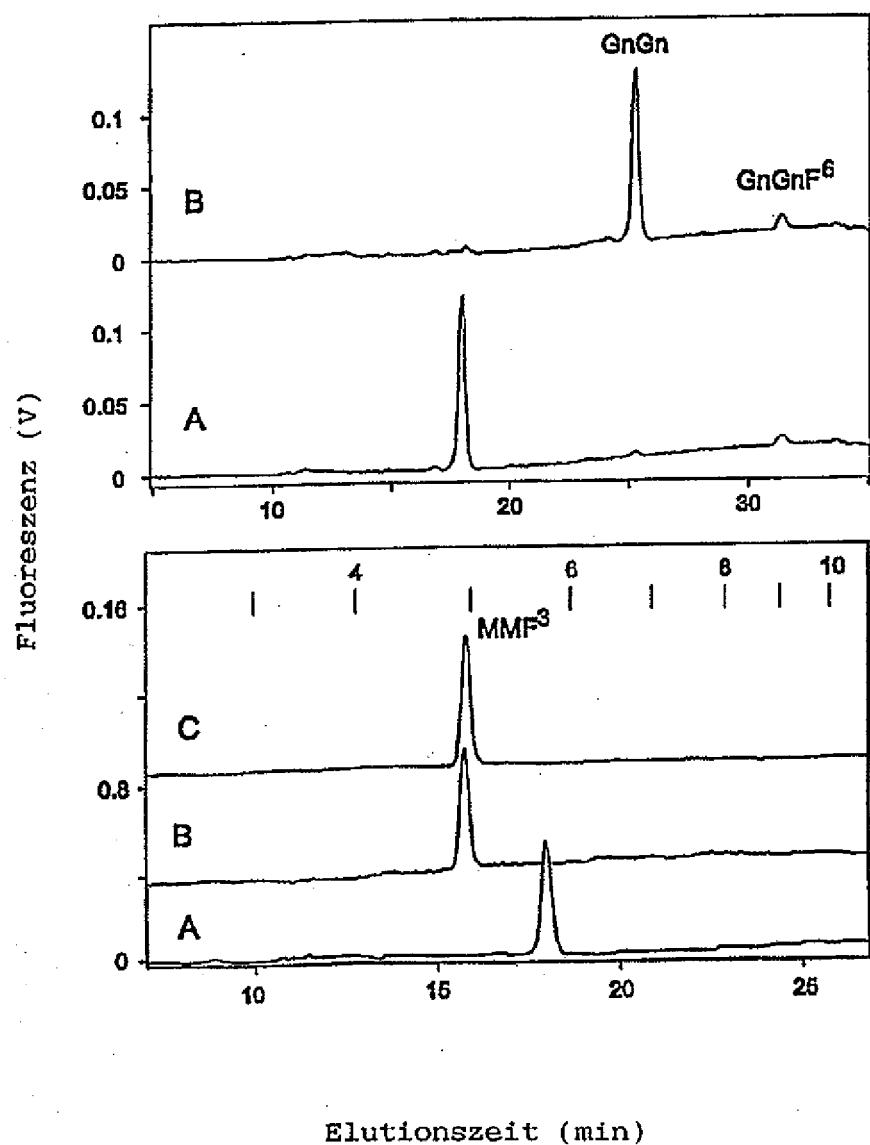


FIG.13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte
lional Application No
PCT/AT 00/00040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N15/54	C12N9/10	C12N15/11	C12N9/00	C12N5/10
	C12P21/00	C12Q1/68			

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>STAUDACHER E. ET AL.: "Functional purification and characterization of a GDP-fucose: beta-N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) alpha-1,3-fucosyltransferase from mung beans" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 12, 1995, pages 780-786, XP002140246 cited in the application page 782, left-hand column, paragraph 3 page 783, left-hand column page 785 -page 786</p> <p style="text-align: center;">—/—</p>	32-34

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubt on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 2000

Date of mailing of the International search report

19/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ional Application No
PCT/AT 00/00040

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALTMANN F.: "More than silk and honey - or, can insect cells serve in the production of therapeutic glycoproteins ?" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 14, 1997, pages 643-646, XP002140795 page 645, left-hand column, paragraph 3	25-28
X	LEROUGE P. ET AL.: "N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 38, 1998, pages 31-48, XP002140796 cited in the application page 44 -page 48	25-28
X	EMBL Database ID: B67847 AC: B67847 Arabidopsis thaliana 09/12/1997 72% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.1102 bis bp.1596, in inverser Orientierung XP002140249 the whole document	1,3,6, 8-10,12
X	EMBL Database ID: AQ158899 AC: AQ158899 Oryza sativa 09/09/1998 63% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.591 bis bp.776 XP002140250 the whole document	1,6,8, 10,12
X	EMBL Database ID: AQ328306 AC: AQ328306 Oryza sativa 11/01/1999 65% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.1486 bis bp.1718, in inverser Orientierung XP002140251 the whole document	1,6, 8-10,12
P,X	LEITER H. ET AL.: "Purification, cDNA cloning and expression of GDP-L-Fuc:Asn-linked GlcNAc alpha-1,3-Fucosyltransferase from mung bean" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 31, 30 July 1999 (1999-07-30), pages 21830-21839, XP002140245 the whole document	1-8,13, 14,29-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte
lational Application No
PCT/AT 00/00040

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>EMBL Database ID: VRA18529 AC: Y18529</p> <p>Vigna radiata mRNA für alpha-1,3-fucosyltransferase (FucT c3) 03/08/1999</p> <p>99.8% Identität mit SEQ ID NO 1 bp. 1 bis bp. 2198 XP002140629 the whole document</p> <p>—</p>	1-5, 10, 31-33
A	<p>STAUDACHER E.: "alpha1,3-fucosyltransferases" TRENDS IN GLYCOSCIENCE AND GLYCOTECHNOLOGY, vol. 8, no. 44, November 1996 (1996-11), pages 391-408, XP000921149</p> <p>page 400, left-hand column, paragraphs D-4. page 401 -page 402 page 404 -page 405</p> <p>—</p>	
A	<p>STAUDACHER E. AND MÄRZ L.: "Strict order of (Fuc to Asn-linked GlcNAc) fucosyltransferases forming core-difucosylated structures" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, vol. 15, 1998, pages 355-360, XP002140247 cited in the application</p> <p>page 356, right-hand column, paragraph 2</p> <p>—</p>	34
A	<p>CRAWLEY S.C. ET AL.: "A plant fucosyltransferase with human Lewis blood-group specificity" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 193, 1989, pages 249-256, XP002140248</p> <p>—</p>	
A	<p>JAMES D.C. ET AL.: "N-glycosylation of recombinant human interferon-gamma produced in different animal expression systems" BIO/TECHNOLOGY, vol. 13, no. 6, 1 June 1995 (1995-06-01), pages 592-596, XP000609442 ISSN: 0733-222X page 595, Left-hand column, paragraph 3</p> <p>—</p>	25-28

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen
PCT/AT 00/00040

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7	C12N15/54	C12N9/10	C12N15/11	C12N9/00	C12N5/10
	C12P21/00	C12Q1/68			

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassefikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprätfot (Klassifikationsystem und Klassifikationsymbole)

IPK 7 C12N C12P C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprätfot gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND

C. ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	<p>STAUDACHER E. ET AL.: "Functional purification and characterization of a GDP-fucose: beta-N-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) alpha-1,3-fucosyltransferase from mung beans" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 12, 1995, Seiten 780-786, XP002140246 in der Anmeldung erwähnt Seite 782, linke Spalte, Absatz 3 Seite 783, linke Spalte Seite 785 -Seite 786</p> <p style="text-align: center;">—/—</p>	32-34



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besonders Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

26. Juni 2000

19/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentamt 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Macchia, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte	Jonales Aktenzeichen
PCT/AT 00/00040	

C.(Fortszung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ALTMANN F.: "More than silk and honey - or, can insect cells serve in the production of therapeutic glycoproteins ?" GLYCOCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 14, 1997, Seiten 643-646, XP002140795 Seite 645, linke Spalte, Absatz 3 ---	25-28
X	LEROUGE P. ET AL.: "N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 38, 1998, Seiten 31-48, XP002140796 in der Anmeldung erwähnt Seite 44 -Seite 45 ---	25-28
X	EMBL Database ID: B67847 AC: B67847 Arabidopsis thaliana 09/12/1997 72% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.1102 bis bp.1596, in inverser Orientierung XP002140249 das ganze Dokument ---	1,3,6, 8-10,12
X	EMBL Database ID: A0158899 AC: A0158899 Oryza sativa 09/09/1998 63% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.591 bis bp.776 XP002140250 das ganze Dokument ---	1,6,8, 10,12
X	EMBL Database ID: A0328306 AC: A0328306 Oryza sativa 11/01/1999 65% Identität mit SEQ ID NO 1 von bp.1486 bis bp.1718, in inverser Orientierung XP002140251 das ganze Dokument ---	1,6, 8-10,12
P,X	LEITER H. ET AL.: "Purification, cDNA cloning and expression of GDP-L-Fuc:Asn-linked GlcNAc alpha-1,3-Fucosyltransferase from mung bean" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 274, Nr. 31, 30. Juli 1999 (1999-07-30), Seiten 21830-21839, XP002140245 das ganze Dokument ---	1-8,13, 14,29-34

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int.	Ionales Aktenzeichen
PCT/AT 00/00040	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
P, X	EMBL Database ID: VRA18529 AC: Y18529 Vigna radiata mRNA für alpha-1,3-fucosyltransferase (FucT c3) 03/08/1999 99.8% Identität mit SEQ ID NO 1 bp. 1 bis bp. 2198 XP002140629 das ganze Dokument —	1-5, 10, 31-33
A	STAUDACHER E.: "alpha1,3-fucosyltransferases" TRENDS IN GLYCOSCIENCE AND GLYCOTECHNOLOGY, Bd. 8, Nr. 44, November 1996 (1996-11), Seiten 391-408, XP000921149 Seite 400, linke Spalte, Absätze D-4. Seite 401 -Seite 402 Seite 404 -Seite 405 —	
A	STAUDACHER E. AND MÄRZ L.: "Strict order of (Fuc to Asn-linked GlcNAc) fucosyltransferases forming core-difucosylated structures" GLYCOCONJUGATE JOURNAL, Bd. 15, 1998, Seiten 355-360, XP002140247 in der Anmeldung erwähnt Seite 356, rechte Spalte, Absatz 2 —	34
A	CRAWLEY S.C. ET AL.: "A plant fucosyltransferase with human Lewis blood-group specificity" CARBOHYDRATE RESEARCH, Bd. 193, 1989, Seiten 249-256, XP002140248 —	
A	JAMES D.C. ET AL.: "N-glycosylation of recombinant human interferon-gamma produced in different animal expression systems" BIO/TECHNOLOGY, Bd. 13, Nr. 6, 1. Juni 1995 (1995-06-01), Seiten 592-596, XP000609442 ISSN: 0733-222X Seite 595, linke Spalte, Absatz 3 —	25-28